R EXD.

Junho de 1954

Tomo 52

Fascículo 2

COMMONWEALTH INST.
ENTOMOLOGY LIBRARY
13 FEB 1956
SERIAL C.S.A.7
SEPARATE

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

DEPARTAMENTO DE IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — BRASIL — 1955

ÍNDICE

Tomo 52 Junho, 1954 Fascículo 2

PÁG.

BARTH, R. — Estudos sôbre os órgãos odoríferos de alguns *Hesperidae* brasileiros — 2ª Parte: Estudos histológicos 261
Studien ueber die Duftorgane brasilianischer *Hesperidiae* — 2. Teil: Histologische Studien (Uebersetzung) 270
BARTH, R. — O órgão odorífero do macho de *Mocis repanda* Fabr., 1794 (*Lepidoptera, Noctuidae, Sarrothripinae*) 287
Das Duftorgan des Maennchens von *Mocis repanda* Fabr., 1794 (*Lepidoptera, Noctuidae, Sarrothripinae*) (Uebersetzung) 296
DIAS, E., — Guerra bacteriológica contra os hospedeiros intermediários da Esquistossomose humana 315
Bacteriological warfare on the intermediate hosts of human Schistosomiasis (Translation) 320
PACHECO, G. — Sôbre a patogenia da gangrena gasosa 329
JACCOUD, R. J. de S., TRINDADE, A. E. — Contribuição ao estudo da fito-imunidade — Nota prévia 361
Beitrag zum Studium der Pflanzenimmunitaet — Vorlaeufige Mitteilung (Uebersetzung) 362
BARTH, R. — O aparelho saltatório do halticíneo *Homophoeta sexnotata* Har. (*Coleoptera*) 365
Der Sprugapparat der Halticine *Homophoeta sexnotata* Har. (*Coleoptera*) (Uebersetzung) 369
UBATUBA, F. — Excreção urinária de 17-Cetoesteroides neutros no cavalo normal e no cavalo castrado 377
TRINDADE, A. E. — Hemograma do coelho normal e mixomatoso 397
Blood counting of normal rabbits (Translation) 400
PACHECO, G., MOREIRA DIAS, V. — Ação bacteriolítica dos fosfatos (Fosfatólise bacteriana) 405
Bacteriolytic action of phosphates (Bacterial phosphatolysis) (Translation) .. 411
SILVA, A. A. J. da — Nova espécie do gênero *Aplectana* Raillet & Henry, 1916 (*Nematoda, Cosmoceridae*) 415
SOUZA-ARAUJO, H. C. de — O problema da lepra no Brasil 419
The leprosy problem in Brazil (Translation) 427
SOUZA-ARAUJO, H. C. de — Novos estudos sôbre a lepra murina 443
New studies rat leprosy (Translation) 449
KRAU, L. — Nova espécie de ouriço do mar: *Cassidulus mitis*, ordem *Cassiduloida, Echinoidea*, capturado na baía de Sepetiba 455
On a new species of recent sea urchin *Cassidulus mitis*, order *Cassiduloida, Echinoidea*, found on the Coast of Sepetiba Bay (Translation) 464
SOUZA-ARAUJO, H. C. de — A doença de Chagas no Paraná 477

As MEMÓRIAS, órgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, são reservadas, exclusivamente, à publicações de trabalhos nêle realizados, e aparecerão em fascículos em Março, Junho, Setembro e Dezembro, ou em tomos completos, conforme as conveniências editoriais.

Tôda a correspondência deverá ser à:

REDAÇÃO DAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926 – ENDERÊÇO TELEGRÁFICO: "MANGUINHOS" RIO
RIO DE JANEIRO – BRASIL

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 52 Junho, 1954 Fascículo 2

R1955

Estudos sôbre os Órgãos Odoríferos de alguns Hesperidae Brasileiros

2.ª PARTE: ESTUDOS HISTOLÓGICOS

por

RUDOLF BARTH

1. Introdução
2. As células glandulares das apófises do metatórax
   a) *Sebaldia busirus*
   b) *Pellicia bromias*
   c) *Pellicia polyctor*
   d) *Heliopetes arsalte*
   e) *Hesperia syrichtus*
3. Resumo
4. Índices nas figuras
5. Bibliografia

1. INTRODUÇÃO

Na primeira parte dos estudos sôbre os órgãos odoríferos de *Hesperidae* (1) foi tratada a morfologia dêstes órgãos e, especialmente, a estrutura das escamas odoríferas e distribuidoras. Foram reservadas as observações histológicas para outros trabalhos. Examinando a bibliografia encontra-se uma descrição mais detalhada das dobras costais por MUELLER (2). Também ILLIG (3) trata dêsses órgãos. Enquanto que MUELLER apenas dá particularidades morfológicas e anatômicas, ILLIG analisa as dobras costais de *Syrichtus malvae* e de *Nisoniades tages* também histológicamente. Sendo

descrito êste tipo como também o sulco odorífero das asas anteriores de algumas espécies e não apresentando essas glândulas particularidades especiais, neste trabalho sòmente é de maior interesse a observação das células glandulares das apófises. Até hoje foram descritos êstes órgãos, apenas morfològicamente, por *Barth* (1). Algumas vêzes, são mencionados na literatura, pinceis de pêlos nas pernas posteriores de certos *Hesperidae* porém não se encontra uma descrição das apófises nas quais estão situadas as células glandulares cuja secreção é justamente evaporada pelos citados pinceis. ILLIG (3) trata dos pinceis de pêlos de *Syrichtus malvae* como um órgão complexo e considera a célula tricogênea das cerdas do pincel como uma célula glandular. Êste engano pode ser explicado pelo fato de ILLIG ter observado concomitantemente as pernas com aparelhos odoríferos de *Hepialus hectus* onde se podem encontrar as células glandulares na base das cerdas de evaporação (BERTKAU (4), DEEGENER (5) e ILLIG).

A descrição morfológica das duas apófises, incluindo as glândulas, demonstra que se encontra nas faces internas e opostas, de cada lado, a área glandular caracterizada, vista de fora, por escamas odoríferas de formação típica. Um exame microanatômico de numerosos *Hesperidae* (com pincel distribuidor nas pernas posteriores e com apófises no metatórax) demonstrou todas as vêzes, a presença de cédulas glandulares bem desenvolvidas na base de cada escama odorífera dos lados internos das apófises.

Encontram-se dois tipos principais nas células glandulares observadas. No primeiro tipo as células são muito grandes e o aparelho condutor atravessa tôda a célula até o polo basal formando um canal comprido dentro da mesma. No segundo tipo encontram-se células pequenas com um aparelho condutor completamente diferente, não atravessando a célula, porém, situando-se bem perto da inserção da escama. E' interessante constatar que o tipo citado primeiramente encontra-se sòmente nas espécies que possuem apenas o citado órgão composto (apófises e pinceis distribuidores) enquanto que o segundo tipo está presente, exclusivamente, nas espécies que, além dêsse órgão composto, têm também, adicionalmente, a dobra costal. Êstes dois tipos aparecem nas diferentes espécies com formas variáveis. Na descrição seguinte são escolhidos alguns exemplos, dos dois tipos para o primeiro, *Sebaldia busirus, Pellicia bromias* e *Pellicia polyctor;* para o segundo *Heliopetes arsalte* e *Hesperia syrichtus*.

2. CÉLULAS GLANDULARES DAS APÓFISES DO METATÓRAX

a) *Sebaldia busirus*

A forma das células glandulares é alongada (fig. 1). No conjunto as células formam uma área bem delimitada. Tôdas as células encostam-se bem entre si não deixando espaços intercelulares. Obedecendo às regras geométricas elas são comprimidas hexagonalmente em forma de favos de modo que aparece num corte transversal o aspecto da fig. 2. As porções triangulares de um protoplasma denso nos ângulos apicais das células correspondem às células hipodérmicas diferenciadas em células tormogêneas situadas entre as células glandulares (células tricogêneas) e a cutícula (fig. 1). Apenas ao redor da inserção da escama a célula glandular atinge a cutícula. Isto quer

dizer que nem tôdas as células da hipoderme tornaram-se glandulares, porém uma parte — justamente as células que não tomaram parte na formação da escama — manteve a formação primitiva.

O eixo longitudinal da célula glandular é representado pelo pedúnculo muito prolongado da escama odorífera. Formado pela exocutícula, que reveste a cavidade do cálice da inserção, nasce do mesmo um tubo quitinoso fino (CL) que passa, na parte basal da célula, para o pedúnculo prolongado da escama. No ponto da transformação do tubo quitinoso em pedúnculo da escama (ST) a quitina é notàvelmente engrossada de modo que assim existe um bordo basal na abertura do pedúnculo da escama. Enquanto que a parede do tubo quitinoso tem uma espessura de 0,3 a 0,4 micra, o pedúnculo da escama representa um tubo extremamente fino com espessura de sua parede de menos que 0,2 micra. No corte transversal (fig. 2) nota-se dentro do tubo quitinoso sob a forma de uma parede mais forte o pedúnculo fino da escama. Do ponto de vista da anatomia comparada o tubo quitinoso é homólogo à membrana de uma inserção normal de escamas.

Com exceção da parte apical, o protoplasma deixa ao redor do tubo do aparelho condutor uma cavidade cilindriforme cujo diâmetro só aumenta perto da abertura basal do pedúnculo da escama. Tôda a cavidade representa um reservatório de secreção (RE). Isto é provado não sòmente pelas localizações dela e do aparelho condutor mas também pela forma do protoplasma que circunda a cavidade. Esta zona protoplasmática forma um manto de material denso fixado em fios granulosos orientados perpendicularmente ao tubo quitinoso e, na base, à abertura do pedúnculo da escama. Esta zona é homóloga à zona condutora em forma radiada que é encontrada em outras glândulas hipodérmicas de insetos. O bordo desta zona e, com isso a parede do reservatório, são irregulares mostrando reentrâncias e saliências (fig. 2, RE). Além desta zona citada o protoplasma possui, na parte basal da célula, numa estrutura fibrilosa menos nítida, perpendicular ao limite basal da célula e, do mesmo modo, à membrana basal, bem desenvolvida (BM). Esta parte do protoplasma pode ser chamada ergastoplasma. Tanto ela como o aspecto da zona radial, são uma característica típica de porções protoplasmáticas através das quais se verifica um transporte muito intenso de material, sendo os fios orientados na própria direção do movimento das substâncias, uma observação já mencionada por MAX HEIDENHAIN (7).

A zona acima citada passa diretamente para a massa principal do protoplasma. A célula apresentada na fig. 1 foi desenhada em estado de plena função secretória. O protoplasma é cheio de vacúolos que faltam na parte basal em cima do ergastoplasma; aqui aparece uma estrutura granulada com grãos muito pequenos, cujo diâmetro sobrepassa pouco o limite da visibilidade que se situa em quase 0,2 micra. Quase até o centro da célula o diâmetro dos vacúolos — no começo muito pequeno — cresce uniformemente. A metade apical do protoplasma possui vacúolos iguais. Êles, depois de cada fixação (CARNOY, GILSON, BOUIN e sublimado-ácido pícrico), estão completamente vazios; não se pode afirmar que a secreção tenha sido dissolvida pelos fixadores ou pelo tratamento seguinte com álcool-benzol. De outro lado, podem-se apresentar em forma de esferas preto-cinzentas (coloração com hematoxilina férrica) depois de uma fixação com ácido ósmico (CHAMPY) (com descoramento por permanganato de potássio e ácido oxálico). Disto pode-se concluir que a secreção representa uma substância gordurosa.

Como já foi descrito, freqüentemente nas células glandulares de insetos, o núcleo, também aqui, sofreu uma modificação típica. O núcleo (veja esquema da fig. 3) é relativamente grande e compõe-se de duas partes grandes situadas nos dois lados opostos do aparelho condutor e ligadas entre si por uma comissura tubiforme. Esta aproxima-se do pólo basal e passa por baixo do fim do aparelho condutor para o outro lado. Esta modificação do núcleo — que não sòmente se relaciona ao aumento do conteudo mas também ao aumento da sua superfície — encontra-se principalmente em células glandulares onde se realiza um movimento intenso de substâncias como por exemplo em glândulas de seda das lagartas de Lepidópteros, glândulas peçonhentas e outras glândulas hipodérmicas (glândula odorífera de *Opsiphanes*, BARTH (6).

A estrutura do núcleo se modifica de acôrdo com a fase da secreção. Em células em repouso, depois de secreção, ou na fase inicial da secreção êle é relativamente pequeno e a cromatina, pelo menos a oxicromatina basófila (coloração com hematoxilina ou safranina) é muito densa deixando visíveis também em cortes finos, poucos espaços livres. Neste estado o protoplasma da célula é homogêneo e finamente granulado. A estrutura fibrilar do aparelho condutor é muito densa de maneira que os fios quase não podem ser isolados òticamente; o ergastoplasma, todavia, mostra poucas alterações em comparação com o do estado ativo. No ponto culminante da fase da secreção (fig. 1) também o núcleo chegou a sua maior atividade. Pelo aumento de todo o lume devido ao acúmulo de líquidos as partes da estrutura nuclear afastam-se; neste processo não há aumento da substância cromática. Na fig. 1 a parte desenhada do núcleo é a de um corte diagonal: ela representa apenas uma metade desta parte do núcleo de modo que os fios espessos e os finos da estrutura aparecem quebrados e cortados, o que vale também para o núcleo da fig. 2 onde sòmente aparece a ponta de uma das duas partes do núcleo.

Provàvelmente o aumento da superfície acima citado está ligado à relação entre núcleo e protoplasma de maneira que pela maior superfície — especialmente em células compridas — o estímulo ao protoplasma, por substâncias nucleares, é facilitado.

Comparando estas observações do protoplasma e do núcleo com a teoria da função do núcleo conclui-se que êste, durante as grandes alterações citológicas do protoplasma, na fase da formação da secreção, também sofre modificações notáveis. Segundo as pesquisas clássicas com partes protoplasmáticas sem núcleo (VERWORRN, GRUBER, BALBIANI, GERASSIMOW e outros, veja literatura em HEIDENHAIN (7), pág. 62) as alterações positivas das estruturas, como especialmente a formação de secreções, são processos autônomos do protoplasma sem participação do núcleo. Para outros a formação de secreção dependeria do núcleo pois consideram os plastósomos como partes cromáticas expelidas pelo núcleo, o que porém ainda não está provado. Apenas na segunda fase da atividade do protoplasma, durante a volta para o estado de repouso, aparece o efeito trófico bilateral entre protoplasma e núcleo. Na época das pesquisas acima citadas, não pôde ser resolvida a questão da influência do núcleo sôbre o protoplasma, ficou aberto o problema: será esta ação de natureza química ou dinâmica? Hoje é sabido que a passagem de derivados de ácidos nucléicos do núcleo para o protoplasma gera uma ação catalítica para a regeneração interna da célula. Se o núcleo durante a fase da formação da secreção aumenta o seu volume e deixa em-

beber as suas partes cromáticas, demonstrando assim modificações da estrutura, temos que considerar êste aumento como formação daqueles catalisadores que induzem a volta do protoplasma para a fase de repouso. A quantidade de substâncias libertadas pelo núcleo, em células glandulares fortemente ativas, é maior que em outras células do corpo. Ela é também grande em células hipodérmicas na época da muda. Nos dois casos ha um aumento notável do volume do núcleo bem como uma reconstrução da sua forma primitiva em repouso depois da regeneração interna do protoplasma. Como observações paralelas podem-se mencionar aqui as células com dois núcleos das glândulas de muitos insetos (*Heteroptera*) e as células dos folículos do ovário com núcleos duplos muito grandes (ovário de *Homoptera*). Êstes fatos são ainda mais marcantes quando o núcleo não tem uma forma arredondada e simétrica (em células menores ou aproximadamente cúbicas) mas se ramifica (em células maiores e cilíndricas) fortemente ou se prolonga numa direção (no sentido do eixo longitudinal do cilindro) como nas glândulas de *Sebaldia busirus*.

Nas células longas da glândula odorífera de *Sebaldia busirus* o núcleo prolongado apresenta, na fase de repouso, uma substância densa, isto é, as granulações de cromatina da estrutura nuclear são pequenas, densas e, em virtude da acumulação da substância cromática, com grande afinidade para certos corantes. A substância intermediária (líquido nuclear), entretanto, é reduzida ao mínimo. Mas, durante o processo de formação das secreções, na fase ativa do protoplasma, o núcleo prepara a eliminação de derivados dos ácidos nucléicos de modo que o aspecto citológico muda completamente. Os grânulos cromáticos sofrem uma forte embebição, suas substâncias cromáticas se dilatam diminuindo a tonalidade da coloração; a substância intermediária aumenta em quantidade atingindo o núcleo, ao finalizar a fase de secreção, o seu maior tamanho. Chega agora o momento do começo da regeneração do protoplasma, o que quer dizer que o núcleo transferiu para ele substâncias elaboradas. Em células pequenas e cúbicas tôdas as partes do protoplasma recebem simultâneamente os líquidos nucleares. Em células alongadas o fornecimento dêsses líquidos verifica-se para tôdas as parte do protoplasma o que é facilitado pela forma ramificada e alongada do núcleo.

O encaminhamento da secreção se realiza por meio de escamas ou cerdas odoríferas já descritas na primeira parte dêste trabalho. Aqui em *Sebaldia busirus* trata-se de cerdas (veja o corte transversal na fig. 4). Não está bem esclarecido como a secreção passa do reservatório para a cerda. De um lado uma grande parte entra, pela abertura basal, no pedúnculo e, de outro, uma certa parte pode difundir-se pelas paredes quitinosas do tubo.

b) *Pellicia bromias*

As células glandulares dessa espécie (que é a H30 citada na primeira parte dêste trabalho) apresentam, em geral, o mesmo tipo como o descrito acima para *Sebaldia busirus*. A célula (fig. 5) forma um cilíndro alongado e encosta-se fortemente às vizinhas. Também aqui o aparelho condutor é composto por um tubo quitinoso muito fino representando a continuação da exocutícula do revestimento do cálice da inserção. Dentro do tubo encontra-se o pedúnculo da escama. Perto da inserção o tubo quitinoso aumenta o seu diâmetro enquanto que o pedúnculo da escama odorífera modifica, sòmente

raras vêzes, a sua espessura de modo que, aqui, os dois tubos, apesar das suas paredes finas, podem ser isolados òticamente com facilidade. Logo depois do alargamento, o tubo e o pedúnculo diminuem os seus diâmetros até 0,6 — 0,7 micra formando um só canal cuja parede compõe-se de duas camadas (veja o esquema da fig. 6). Estas camadas sendo muito finas (menos de 0,2 micra) e provàvelmente coladas entre si, deixaram observar, apenas algumas vêzes, a sua composição. Êste tubo atravessa descrevendo muitas curvaturas (fig. 5 e 6 GG), o corpo de tôda a cédula e termina perto do polo basal da mesma por uma abertura estreita. No protoplasma o ergastoplasma aparece ainda mais nìtidamente que em *Sebaldia busirus*, não tendo sido possível observar um reservatório. A zona condutora, outrossim, está presente e representada por um manto protoplasmático em redor do tubo quitinoso e não se pôde observar nessa região de material denso e finamente granulado nenhuma estrutura. Numa célula em atividade (fig. 5) todo o protoplasma é tomado por vacúolos pequenos e muito pequenos sem formação de camadas.

Os núcleos são caracterizados por uma polimorfia muito intensa. Cada célula tem a sua forma nuclear própria. O núcleo sempre é comprido e percorre formando curvaturas em tôrno do seu eixo longitudinal uma grande parte da altura da célula (fig. 6). Em tôdas as partes encontram-se saliências e reentrâncias da parede nuclear. Em geral a extremidade basal é um pouco claviforme (em células em maior atividade).

A estrutura cromática do núcleo mostra nas diferentes fases de atividade o mesmo aspecto como o citado acima para *Sebaldia*. Em *Pellicia bromias* nota-se com mais nitidez o que foi observado em *Sebaldia* a respeito da relação entre núcleo e protoplasma. Mas, neste caso, a superfície do núcleo está relativamente muito aumentada pela sua polimorfia.

Quanto à relação núcleo-protoplasmática chama-se a atenção para a fig. 7. Trata-se da extremidade basal do núcleo de uma célula no ponto culminante da secreção. O núcleo é extremamente frouxo de modo que se podem isolar òticamente as estruturas cromáticas com facilidade. Do núcleo foi desenhado apenas uma camada de uma espessura de 1 à 2 micra de maneira que o foco do microscópio não foi mudado e foram desenhadas sòmente as estruturas que apresentavam contôrnos nítidos. Pode-se notar as partes da rede de linina situadas nesta camada. Elas são sempre menos coradas do que as granulações cromáticas nelas incluidas — neste caso foi empregada fixação de CARNOY com sublimado e coloração da oxicromatina pela hematoxilina férrica. Não se poderá desenhar com êste método um aspecto correspondente ao do núcleo em repouso pois o corte sairá quase completamente preto e só com poucos espaços livres, de modo que não se consegue isolar tècnicamente um plano ótico.

c) *Pellicia polyctor*

Um aspecto completamente diferente nos é apresentado pela célula glandular de *Pellicia polyctor*. A inserção do pedúnculo da escama odorífera penetra só um pouco na célula (fig. 8). E' formada apenas por um tubo quitinoso curto com duas paredes compondo-se do prolongamento da parede do cálice da inserção e do pedúnculo da escama muito mais fino. O canal tem na base uma abertura e aumenta em forma de um funil. Entra num reserva-

tório comprido e delgado cuja parede consta de uma camada muito fina de um protoplasma modificado com uma afinidade para hematoxilina um pouco maior que a do protoplasma restante. A parede interna do reservatório não é lisa mas, irregularmente rugosa. O reservatório atravessa em forma de um tubo tôda a célula. Na parte basal êle é ligeiramente aumentado lembrando assim a formação correspondente em *Sebaldia busirus*. Êle é em forma de manto, circundado por uma zona condutora com protoplasma nìtidamente fibrilar (figura radiada). O plasma restante da célula tem a mesma formação como na espécie anterior. O núcleo, com as mesmas propriedades da estrutura cromática das da espécie já tratada acima, tem uma divisão em dois corpos principais ligados por uma comissura em forma de arco de modo que no corte transversal aparece como um U. (fig. 9). O reservatório e o aparelho condutor estão sempre situados por dentro do espaço circundado pelo núcleo. As escamas odoríferas são muito grossas e suas duas lamelas são mantidas equidistantes, da base até a ponta, por um conjunto de trabéculas transversais que no centro do corte transversal mostram anastomoses irregulares (fig. 10). Esta estrutura lembra a das escamas odoríferas encontradas em *Eriopyga lamptera* (BARTH, 1950) que possuem uma grande atividade capilar.

d) Heliopetes arsalte

As células glandulares de *Heliopetes arsalte* apresentam um tipo diferente. Êste se relaciona à formação do aparelho condutor. A célula, como no primeiro tipo tem uma forma cilíndrica duas a três vêzes mais comprida do que larga. O aparelho condutor toma sòmente a parte apical da célula (figs. 11, 12 e 13). Êle é formado pela inserção da escama odorífera, como no tipo anterior, submersa dentro da célula. O cálice da inserção sempre é fortemente inclinado para a parte posterior da apófise de maneira que o tubo quitinoso, apresentando um prolongamento das paredes exocuticulares do revestimento da cavidade de inserção, atravessa o integumento inclinadamente e, neste sentido, entra no protoplasma da célula. Aproximadamente no centro da célula o tubo quitinoso forma uma duplicação lateral que sai em forma de um anel para os lados apresentando um colarinho largo. Na sua extremidade o tubo aumenta o seu diâmetro e passa para o pedúnculo da escama que sobe por dentro do tubo para a inserção. Enquanto que o tubo quitinoso é formado por uma camada de quitina relativamente grossa e muito dura, o tubo do pendúnculo da escama é muito fino (menos que 0,2 micra).

Em redor da parte basal do tubo quitinoso o protoplasma deixa aberta uma grande cavidade representando o reservatório de secreção (RE). A saliência lateral do tubo, chamado acima colarinho, forma o teto desta cavidade. A abertura do pedúnculo da escama encontra-se quase no centro do espaço do reservatório cuja parede sempre é nìtidamente limitada por um protoplasma diferente, não apresentando uma camada de quitina. O reservatório é circundado por uma zona de protoplasma fibrilar (figura radiada, zona condutora). Na parte basal da célula encontra-se mais uma zona fibrilar, a zona do ergastoplasma com fibras perpendiculares à área basal da célula e à forte membrana basal.

Por cima do ergastoplasma, na parte basal da célula, o protoplasma, na fase de secreção, possui vacúolos menores bem limitados. Êstes se fundem aumentando seus tamanhos quando se deslocam em direção à zona condutora, porém nunca formam grandes vacúolos de armazenamento. Em estado de repouso o protoplasma é muito denso, homogêneo e com finas granulações. Depois de fixação pelo ácido ósmico deixa observar uma granulação mais grossa na parte basal. Os vacúolos se mostram sempre vazios, apenas pela fixação com ácido ósmico pôde ser constatada uma secreção negra. Por outro lado consegue-se coagular a secreção no reservatório por cada um dos fixadores anteriormente citados. Esta secreção apresenta uma forte reação ácida. Esta observação é de interêsse especial para o nosso conhecimento sôbre a formação de secreções, pois ficamos sabendo que a secreção nos vacúolos do protoplasma é uma substância diferente da encontrada no reservatório. Se esta diferença é de natureza química ou sòmente física não pode ser determinado. A transformação de uma substância em outra se pode verificar, de um lado, na zona condutora ou durante a passagem pela camada limiar ou, por outro, pode ser explicada pela perda de substâncias ou pela embebição. Nada pode ser dito sôbre o estado físico da secreção, apenas é de se supor que é um líquido, pois a secreção tem que passar através o pedúnculo muito fino da escama para dentro da cavidade da mesma para depois se evaporar. Enquanto que na fase de repouso as fibras da zona condutora estão paralelas bem encostadas entre si (veja a fig. 7) elas, na fase ativa, são irregulares e fortemente afastadas formando cavidades entre elas (veja fig. 11).

O núcleo sempre se encontra do lado basal da zona condutora. Êle é prolongado em direção ao eixo longitudinal da célula (fig. 11). Nas células, perto dos bordos da área glandular, os núcleos são assimétricos correspondendo à assimetria das próprias células (figs. 14 b e c). O bordo basal do núcleo é regularmente arredondado enquanto que o apical sempre mostra saliências e dentes que provàvelmente servem para o aumento da superfície, como já foi descrito no caso de *Sebaldia busirus* (fig. 14e). A cromatina em núcleos de células grandulares ativas e em repouso sofre as mesmas alterações como já foi descrito acima. Na fig. 11 é desenhado um núcleo do qual foi cortado, na parte apical, um segmento de modo que o nucléolo está bem visível.

Do mesmo modo que para os tipos de glandulas já mencionados, aqui também parmanecem as células hipodérmicas e as tormogêneas (figs. 8, 9, 11 e 12, TG).

e) *Hesperia syrichtus*

Encontra-se na célula glandular de *Hesperia syrichtus* o mesmo tipo como na espécie anteriormente descrita. A forma das células não é mais cilíndrica e comprida, e sim, mais larga que comprida (figs. 15 e 17). Além desta diferença, comparando indivíduos do mesmo tamanho, os desta espécie apresentam as células glandulares menores. O aparelho condutor não

está situado centralmente, na parte apical de célula, mas encontra-se lateralmente na mesma dando, assim, um aspecto assimétrico. As células hipodérmicas e tormogêneas podem ser observadas perto da inserção da escama odorífera. A inserção e o aparelho condutor têm a mesma estrutura como em *Heliopetes arsalte*, apenas a inclinação do canal de inserção é menor. O aparelho condutor percorre a célula achatada quase até o bordo da base, onde se observa a membrana basal. O colarinho cuticular, aqui também representando o teto do reservatório, é aumentado formando, perto do tubo quitinoso, um sulco anular. Na abertura do pedúnculo da escama não se encontra um aumento como o que foi descrito na espécie anterior (fig. 16). Muito visível e desenvolvida a zona condutora protoplasmática apresenta fibras plasmáticas bem nítidas, enquanto que a zona ergastoplasmática quase não aparece. As alterações no protoplasma e no núcleo que surgem durante as fases de secreção são as mesmas observadas em *Heliopetes arsalte*. Na figura 15, no lado esquerdo, foi desenhado um núcleo cortado justamente no centro. Os bordos do núcleo não deixam ver saliências ou dentes como na espécie anterior, porém aparece, também aqui, um aumento da superfície em forma de um prolongamento tubular, mais ou menos comprido partindo da base, sempre inclinado, para a zona condutora.

3. RESUMO

São descritas as células glandulares das apófises do metatórax dos machos de alguns *Hesperidae*. As apófises possuem glândulas odoríferas já descritas morfològicamente na primeira parte dêste trabalho.

Os orgãos compõem-se de elementos glandulares independentes e unicelulares cuja secreção é excretada de cada célula por uma escama odorífera e evaporada pela superfície da mesma.

Os principais componentes das células glandulares são:

a) corpo plasmático ativo que apresenta alterações citológicas típicas para as fases de repouso e de secreção, com zona basal de ergastoplasma e uma zona condutora incluindo um reservatório de secreção;

b) o núcleo apresenta um aumento da superfície bem como, certas alterações durante as fazes de secreção, condicionadas pelas trocas entre núcleo e protoplasma;

c) aparelho condutor de natureza quitinosa formado em tôdas as espécies pela inserção da escama. À respeito do aparelho condutor são descritos dois tipos de células glandulares:

1 — Células grandes com um canal muito prolongado que a atravessa em toda extensão;

2 — Células pequenas com canal condutor curto percorrendo sòmente a parte apical da mesma. Êle ocupa uma posição simétrica ou assimétrica.

O primeiro tipo encontra-se em espécies possuindo sòmente êste aparelho como único órgão odorífero. O segundo tipo aparece em formas que têm, além das glândulas nas apófises, mais uma dobra costal também considerada como aparelho odorífero.

4. ÍNDICES DAS FIGURAS

EM Membrana basal; CG Granulações de cromatina; CL Tubo quitinoso; CU Cutícula; DS Escama odorífera; EG Ergastoplasma; EW Aumento do canal condutor; GG Canal condutor; IB Cálice de inserção; IZ Espaço intercelular; KD Núcleo glandular; KM Membrana nuclear; KR Aumento anular; LG Fios de linina; NL Núcléolo; OE Esôfago; PL Protoplasmas; RE Reservatório; RE' Aumento do reservatório; RI Estrias; RN Sulco anular; SF Zona condutora; ST Pedúnculo da escama; TA Trabécula; TG Célula formogênea; TR Traquéia; VS Comissura do núcleo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Barth, R.,

1952. Estudos sôbre os órgãos odoríferos de alguns *Hesperidae brasileiros*, Memórias do Inst. Oswaldo Cruz, **50:** 423-556, 47 figs., 1 tab.

2. Mueller, F.,

1878. A prega costal das Hesperideas, Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro, **3:** 41-50, ests. 50-51.

3. Illig, K. G.,

1924. Duftorgane der maennlichen Schmetterlinge, Zoologica, **38:** 1-34, ests. 1-5.

4. Bertkau, Ph.,

1882. Ueber den Duftapparat von *Hepialus hecta*, Stettin. Entomol. Zeitschr., **43.**

5. Deegener, R.,

1902. Das Duftorgan von *Hepialus hecta*, Z. wiss. Zool., **71.**

6. Barth, R.,

1952. Die Hautdruesen des Maennchens von *Opsiphanes invirae isagoras Fruhst.* Zool. Jb., **72:** 216-230, 11 figs., 1 tab.

7. Heidenhain, M.,

1907. Plasma und Zelle, Jena.

UEBERSETZUNG

Studien ueber die Duftorgane brasilianischer Hesperidae

2. TEIL: HISTOLOGISCHE STUDIEN

1. Einleitung
2. Die Druesenzellen der Apophysen des Metathorax
   a) *Sebaldia busirus*
   b) *Pellicia bromias*
   c) *Pellicia polyctor*
   d) *Heliopetes arsalte*
   e) *Hesperia syrichtus*

3. Zusammenfassung, Summary
4. Abkuerzungen in den Figuren
5 Literatur (siehe portug. Teil).

1. EINLEITUNG

Im ersten Teil der Studien ueber die Duftorgane der *Hesperidae* (1) wurde auf die Morphologie dieser Apparate und insbesondere auf den Bau der Duft-und Verteilerschuppen eingegangen. Die histologischen Untersuchungen sollten weiteren Arbeiten ueberlassen bleiben. Im Vergleich mit der vorliegenden Literatur ergibt sich, dass von den beschriebenen Dufteinrichtungen naehere Darstellungen der Costalumschlaege bereits bei MUELLER gefunden werden (2). Ebenfalls geht ILLIG (3) auf diese Organe ein. Waehrend MUELLER aber nur morphologische und anatomische Einzelheiten gibt, untersucht ILLIG die Costalumschlaege von *Syrichtus malvae* und *Nisoniades tages* auch histologisch. Da dieser Typ, wie auch die Duftrinne auf den Vorderfluegeln einiger Arten, eine Beschreibung erfahren haben und andererseits diese Druesen histologisch keine besonderen Merkmale aufweisen, interessiert in dieser Arbeit mehr die Untersuchung der Druesenzellen der Apophysen des Metathorax. Diese Organe wurden bisher nur morphologisch von BARTH (1) beschrieben. Wohl werden in der Literatur an den Hinterbeinen gewisser *Hesperidae* verschiedentlich Haarpinsel erwaehnt, doch befindet sich keine Beschreibung der Apohysen, in denen die Druesenzellen lokalisiert sind, deren Sekret eben von diesen Pinseln zur Verdunstung gebracht wird. ILLIG (3) beschreibt die Haarpinsel von *Syrichtus malvae* als vollstaendiges Duftorgan und sieht die trichogenen Zellen der Pinselborsten als Druesenzellen an. Dieser Irrtum erklaert sich durch die gleichzeitige Bearbeitung der Beine mit Duftapparaten von *Hepialus hectus,* wo sich die Druesenzellen wirklich an der Basis der Verdunstungsborsten nachweisen lassen (BERTKAU (4), DEEGENER (5) und ILLIG).

Die morphologische Beschreibung der beiden Druesen tragenden Apophysen ergibt, dass an den Innenseiten, also einander zugewandt, sich je ein Duftdruesenfeld befindet, das aeusserlich durch typisch ausgebildete Duftschuppen gekennzeichnet wird. Eine mikroanatomische Nachpruefung zahlreicher Hesperiden mit Verteilerpinseln an den Hinterbeinen und Apophysen am Metathorax ergab in jedem Falle wohlentwickelte Druesenzellen an der Basis jeder Duftschuppe der Apophyseninnenseite.

Unter den beobachteten Druesenzellen finden sich zwei Haupttypen: Beim ersten Typ sind die Zellen sehr gross und der Ausleitungsapparat stoesst fast durch die ganze Zelle bis zum Basalpol, einen langen Kanal in der Zelle bildend. Beim zweiten Typ trifft man relativ kleine Zellen mit einem vollstaendig anderen Ausleitungsapparat, der sich nicht durch die Zelle erstreckt, sondern sich unmittelbar an die Schuppeninsertion anschliesst.

Es ist interessant festzustellen, dass der erstgenannte Typ nur bei solchen Arten vorkommt, die als Duftapparat nur dieses Komplexorgan (Apophysen und Verteilerpinsel) besitzen, waehrend sich der zweite Typ ausschliesslich bei Arten findet, die ausser diesem Komplexorgan auch noch den Costalumschlag fuehren. Diese beiden Typen sind immer wieder in abgeaenderter Form bei den verschiedenen Arten zur Ausbildung gekommen.

Es werden in der folgenden Beschreibung von beiden Typen einige Beispiele ausgewaehlt; fuer den ersten Typ *Sebaldia busirus, Pellicia bromias* und *Pellicia polyctor*. fuer den zweiten Typ *Hesperia syrichtus* und *Heliopetes arsalte*.

2. DIE DRUESENZELLEN DER APOPHYSEN DES METATHORAX

a) *Sebaldia busirus*

Die Form der Druesenzelle ist lang-cubisch (Fig. 1). In der Gesamtheit bilden die Zellen ein geschlossenes Feld, alle Zellen legen sich mit den Laengsseiten eng aneinander, keine Interzellularraeume bildend. Dabei werden sie — den geometrischen Regeln entsprechend — wabenfoermig, sechseckig abgeflacht, so dass im Querschnitt das Bild der Fig. 2 sichtbar wird. Die an den Zellecken erscheinenden dreieckigen Protoplasmateile von dichter Konsistenz entsprechen den Hypodermiszellen bezw. den tormogenen Zellen, die (Fig. 1) zwischen den Druesenzellen (trichogene Zellen) und der Cuticula gelegen sind. Nur in unmittelbarer Umgebung der Schuppeninsertion stoesst die Druesenzelle an die Cuticula. Das bedeutet, dass nicht alle Hypodermiszellen druesig geworden sind, sondern ein Teil — eben die nicht an der Schuppenbildung beteiligten Zellen — seine urspruengliche Natur behalten hat.

Die Achse der Druesenzelle wird von dem ueberaus verlaengerten Stiel der Duftschuppe gebildet. Von der Insertion entspringt, von der den Hohlraum des Insertionsbechers ausfuellenden Exocuticula gebildet, ein duenner Chitinschlauch (CL), der im basalen Teil der Zelle in den verlaengerten Stiel der Schuppe uebergeht. An der Uebergangsstelle vom Chitinschlauch in den Stiel der Schuppe (ST) ist das Chitin auffallend verdickt, so dass ein basaler starrer Oeffnungsrand des Schuppenstiels gegeben ist. Wenn schon der Chitinschlauch eine Wandstaerke von etwa 0,3 — 0,4 µ besitzt, stellt der Schuppenstiel einen ueberaus duennen Schlauch mit weniger als 0,2 µ Wandstaerke dar. Auf dem Querschnitt (Fig. 2) sieht man in dem Chitinschlauch mit staerkerer Wand den duennen Schuppenstiel liegen. Vergleichend anatomisch ist der Chitinschlauch mit der Insertionsmembran einer normalen Schuppeninsertion zu homologisierem.

Mit Ausnahme des apikalen Teils hat das Protoplasma um den Schlauch des Ausleitungsapparates einen zylinderfoermigen Hohlraum freigelassen, der basal an der Oeffnung des Schuppenstiels einen groesseren Raum bildet. Der Hohlraum ist als Sekretsammelraum (RE) zu betrachten. Hierfuer spricht nicht nur seine, den Ausleitungsapparat einschliessende Lage, sondern auch die Form der ihn umgebenden Protoplasmazone. Sie bildet einen Mantel von dichtem Material, das in koernigen Faeden fixiert ist, die senkrecht auf den Chitinschlauch, bezw. an der Basis auf die Oeffnung des Schuppenstiels zulaufen. Diese Zone stellt die aus anderen Hautdruesen der Insekten bekannte Strahlenfigur oder Ausleitungszone dar. Der Rand dieser Zone und damit die Wandung des Sekretsammelraumes ist unregelmaessig geformt, oft Einbuchtungen und flache Erweiterungen zeigend (Fig. 2, RE'). Ausser dieser geschilderten Zone zeigt das Protoplasma im basalen Zellteil eine schwaecher gekennzeichnete, streifige Struktur, die senkrecht auf der Basalgrenze der Zelle und damit auch ebenso auf der deutlichen Basalmem-

bran (BM) steht. Dieser Protoplasmateil ist als Ergastoplasma zu bezeichnen. Er ist, wie die Strahlenfigur, typisch fuer Protoplasmazonen, durch die ein lebhafter Stofftransport gerichtet ist, wobei die Faeden in Richtung der Materialbewegung orientiert sind, ein Umstand, auf den bereits MAX HEIDENHAIN (7) aufmerksammacht.

Diese letzgenannte Zone geht ohne scharfen Uebergang in die Hauptmasse des Protoplasmas ueber. In der in Fig. 1 abgebildeten Zelle ist ein Stadium in voller Sekretion dargestellt worden. Das Protoplasma ist voller Vakuolen, die im basalen Teil oberhalb des Ergastoplasmas fehlen; hier erscheint eine koernige Struktur mit sehr feinen Granulationen, deren Durchmesser gerade an der Sichtbarkeitsgrenze liegt, bei etwa 0,2 μ. Bis etwa zur Mitte der Zelle nimmt der Durchmesser der zuerst sehr kleinen Vakuolen staendig zu. Die apikale Haelfte des Protoplasmas zeigt gleichgrosse Vakuolen. Sie sind nach allen Fixierungen (CARNOY, GILSON, BOUIN und Sublimat-Pikrinsaeure) vollkommen leer; ob das Sekret durch die Fixadoren oder die Nachbehandlung mit Alkohol-Benzol herausgeloest wurde, war nicht zu entscheiden. Dagegen laesst es sich nach Fixierung mit Osmiumsaeure (CHAMPY) als schwarzgraue Kugeln (Faerbung mit Eisenhaematoxylin) nachweisen (vorhergehende Bleichung mit Kaliumpermanganat und Oxalsaeure). Hieraus ist zu schliessen, dass es sich bei dem Sekret um eine fettartige Oelsubstanz handelt.

Wie schon haeufig fuer Druesenzellen der Insekten beschrieben, hat auch hier der Kern eine charakteristische Umgestaltung erfahren: Er ist (siehe Schema der Fig. 3) relativ gross und besteht aus zwei grossen Teilen, die an zwei gegenueberliegenden Seiten des Ausfuehrapparates liegen und durch ein schlauchfoermiges Verbindungsstueck mit einander verbunden sind. Letzteres naehert sich dem basalen Pol und laeuft unter dem Ende des Ausfuehrapparates her auf die Gegenseite. Diese Umgestaltung des Kerns, die sich nicht allein auf Volumenvergroesserung sondern mehr noch auf die Vergroesserung der Oberflaeche bezieht, findet sich vornehmlich bei Zellen druesiger Natur, in denen ein reger Stoffumsatz vor sich geht, wie z. B. in Spinndruesen von Lepidopterenraupen, in Giftdruesen und anderen Hautdruesen (Duftdruese von *Opsiphanes,* BARTH (6).

Die Kernstruktur aendert sich mit dem Sekretionszustand. In Zellen, die sich in Sekretionsruhe oder in beginnender Sekretion befinden, ist er relativ klein und das Chromatin, zumindest das basophile Oxychromatin (Faerbung mit Haematoxylin oder Safranin), liegt dicht gedraengt) auch in duennen Schnitten wenige freie Raeume offen lassend. In diesem Stadium ist das Protoplasma der Zelle homogen und sehr fein granuliert. Die Streifenstruktur des Ausfuehrapparates ist sehr dicht, so dass die Faeden kaum optisch zu isolieren sind; das Ergastoplasma dagegen zeigt gegen das aktive Stadium wenig Aenderung. Auf dem Hoehepunkt der Sekretionsphase (Fig. 1) hat auch der Kern seine hoechste Aktivitaet erreicht. Die Teile des Chromatingeruestes sind weit auseinander gerueckt unter Vergroesserung des Gesamtvolumens durch Aufnahme von Fluessigkeit, nicht durch Vermehrung der Chromatinsubstanz. In Fig. 1 ist das gezeichnete Teilstueck des Kerns schraeg durchschnitten, stellt also nur eine Haelfte dieses Stuecks dar, so dass die groben und feinen Faeden des Geruestes nur in Bruchstuecken vorhanden sind. Dasselbe gilt fuer den Kern in Fig. 2, bei dem nur die Spitze eines Teilstueckes erscheint.

Vermutlich steht die oben erwaehnte Vergroesserung der Oberflaeche mit der Kern-Protoplasma-Relation in der Weise in Verbindung, dass durch die groessere Oberflaeche — besonders in langgestreckten Zellen — die Beeinflussung des Protoplasmas durch Kernsubstanzen erleichtert wird.

Setzen wir die Beobachtungen an Protoplasma und Kern gegenueber und suchen die Befunde mit der Kernlehre in Verbindung zu bringen, so werden wir zu dem Schluss gefuehrt, dass der Kern waehrend der grossen cytologischen Veraenderungen des Protoplasmas, zur Zeit der Sekretbildung, ebenfalls auffallende Strukturaenderungen durchlaeuft. Nach den klassischen Versuchen mit kernlosen Protoplasmateilen (VERWORRN, GRUBER, BALBIANI, GERASSIMOW u. a. siehe die Literaturnachweise bei HEIDENHAIN (7), Seite 62) sind die positiven Gestaltsveraenderungen, wie besonders die Sekretbildung, autonome Vorgaenge des Protoplasmas, also Vorgaenge ohne Einwirkung des Kerns; es sei denn, dass man die Verfluessigung von vorgebildeten Plastosomen als Einwirkung des Kerns insofern betrachten will, dass die Plastosomen ausgestossene Chromatinteile darstellen, was aber absolut noch nicht voellig erwiesen erscheint. Erst in der zweiten Phase der Protoplasmataetigkeit, bei der Zurueckfuehrung in den Ruhezustand, tritt die trophische Wechselwirkung zwischen Protoplasma und Kern in Erscheinung. Zur Zeit der genannten Untersuchungen konnte die Frage der Einwirkung des Kerns auf das Protoplasma noch nicht entschieden werden, es blieb die Frage der substantiellen oder dynamischen Einwirkung absolut offen. Heute ist es uns gelaeufig, dass die Ausstossung von Nukleinsaeurederivaten aus dem Kern in das Protoplasma eine katalytische Wirkung auf die interne Regeneration der Zelle ausuebt. Wenn also der Kern zur Zeit der Sekretbildung an Volumen zunimmt, seine Chromatinteile quellen laesst und damit verbunden Struktur-und Formveraenderungen zeigt, so haben wir darin nichts anderes zu erblicken, als die Bildung jener Katalysatoren, die die Protoplasmamassen veranlassen, wieder in den Ruhezustand zurueckzukehren.

Die Menge der vom Kern ausgesandten Substanzen ist bei stark sezernierenden Druesenzellen groesser als bei anderen Koerperzellen; ebenfalls gross ist sie bei Hypodermiszellen zur Zeit der Haeutung. In beiden Faellen sehen wir eine starke Zunahme des Kernvolumens und eine Rueckkehr zu seiner urspruenglichen, d. h. Ruhegestalt, nachdem die interne Plasmaregeneration stattgefunden hat. Als parallele Erscheinungen sind hier weiterhin anzufuehren die doppelkernigen Zellen der Speicheldruesen vieler Insekten (*Heteroptera*) und die Zellen der Eifollikel im Ovarium mit sehr grossen Doppelkernen (Ovarium von *Homoptera*). Diese Erscheinungen sind besonders deutlich, wo der Kern keine gleichfoermige runde Gestalt (in kleineren oder mehr oder weniger cubischen Zellen) aufweist, sondern wo er sich (in groesseren und zylindrischen Zellen) stark verzweigt oder in einer Richtung (der der Laengsachse des Zylinders) gestreckt hat, wie es bei den Druesen von *Sebaldia busirus* der Fael ist.

Bei den hohen Zellen der Duftdruese von *Sebaldia busirus* sehen wir in der Ruhephase den langgestreckten Kern mit dichter Substanz, d. h. die Chromatingranula des Kerngeruests sind klein, dicht und stark faerbbar wege Anhaeufung der chromaffinen Substanz. Die Zwischensubstanz (Kernfluessigkeit) dagegen ist auf ihr Minimum reduziert. Waehrend der zunehmenden Sekretbildung in der Arbeitsphase des Protoplasmas dagegen, bereitet sich der Kern auf die Ausschuettung der Nukleinsaeurederivate vor,

d. h. das cytologische Bild veraendert sich vollstaendig : Die Chromatingranula gehen in starke Quellung ueber, ihre chromaffine Substanz wird dillatiert, so dass der Farbton schwaecher wird; die Zwischensubstanz nimmt an Menge zu und damit erreicht gegen Ende der Sekretionsphase des Kerns seine maximale Groesse. Jetzt tritt der Augenblick ein, wo die Protoplasmaregeneration beginnen muss, d. h. der Kern muss die vorbereiteten Substanzen dem Protoplasma mitteilen. Bei kleinen cubischen Zellen werden alle Protoplasmateile mehr oder weniger gleichmaessig erreicht. Bei langgestreckten Zellen ist die Abgabe an alle Protoplasmabezirke durch die verzweigte oder kompride Form des Kerns gesichert.

Die Ausleitung des Sekrets erfolgt durch Duftschuppen oder Duftborsten, wie sie im ersten Teil dieser Arbeit geschildert wurden. Hier bei *Sebaldia* handelt es sich um Borsten, von denen in Fig. 4 ein Querschnitt dargestellt ist. In welcher Weise das Sekret aus dem Sammelraum in die Borste uebertritt, ist nicht endgueltig zu entscheiden. Einerseits wird ein grosser Teil durch die basale Oeffnung in den Stiel eindringen, andererseits kann ein gewisser Teil durch die Chitinwaende des Schlauches diffundieren.

b) *Pellicia bromias*

Die Druesenzellen dieser Art (entsprechend H 30 des ersten Teils dieser Arbeit) stellen grundsaetzlich denselben Typ dar, wie er von *Sebaldia busirus* oben beschrieben wurde. Die Zelle (Fig. 5) bildet einen langgestreckten Zylinder und schliesst sich mit den benachbarten Zellen eng zusammen. Der Ausfuehrapparat wird wiederum von einem sehr duennen Chitinschlauch gebildet, der eine Verlaengerung der den Insertionsbecher auskleidenden Exocuticula darstellt. In ihm findet sich der Stiel der Schuppe. Im Anschluss an die Insertion erweitert sich der Chitinschlauch und in etwas geringerem Masse auch der Stiel der Duftschuppe, so dass hier beide Schlaeuche trotz ihrer sehr duennen Waende optisch leicht zu isolieren sind. Bald darauf verengert sich das Lumen zu einem duennen Kanal mit einem Durchmesser von 0,6 — 0,7 µ, dessen Wandung aus zwei Schichten besteht (siehe das Schema der Fig. 6), die jedoch einerseits sehr duenn sind (weit unter 0,2 µ), andererseits wahrscheinlich verkittet sind, da nur an Bruchstellen einige Male die Schichten getrennt beobachtet werden konnten. Dieser Schlauch durchzieht in vielfachen Windungen (Fig. 5 und 6 GG) den ganzen Zelleib und endet nahe am basalen Zellpol mit einer sehr duennen Oeffnung. Im Plasma ist das Ergastoplasma sehr stark ausgebildet, staerker als bei *Sebaldia busirus*, waehrend ein Sekretsammelraum nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ausleitungszone jedoch ist vorhanden, stellt aber nur einen Protoplasmamantel fuer den Chitinschlauch dar, ohne dass in diesser dichten, sehr fein granulierten Zone irgendwelche Strukturen sichtbar sind. In einer aktiven Zelle (Fig. 5) ist das gesamte Protoplasma von kleinen und sehr kleinen Vakuolen eingenommen, die jedoch keine Zonen bilden.

Die Kerne zeichnen sich durch eine starke Polymorphie aus. Jede Zelle hat ihre besondere Kernform. Immer ist der Kern langgestreckt und durchlaeuft mehrfach gewunden und sich dabei um die eigene Laengsachse drehend einen grossen Teil der Laengsrichtung der Zelle (Fig. 6). In allen Teilen finden sich Auswuechse und Einbuchtungen der Kernwandung. In der Regel ist das basale Ende etwas keulig angeschwollen (in aktiven Zellen).

Das Kerngeruest zeigt in den verschiedenen Sekretphasen den gleichen Anblick wie oben fuer *Sebaldia* beschrieben. Hier gilt in verstaerktem Masse, was ueber die Kern-Protoplasma-Relation oben gesagt wurde, da hier die Kernoberflaeche durch die polymorphe Gestalt relativ wesentlich vergroessert ist.

In Bezug auf das Wechselspiel zwischen Kern und Protoplasma ist hier auf die Fig. 7 aufmerksam zu machen. Es handelt sich um das basale Ende eines Kerns einer Zelle, die auf dem Hoehepunkt der Sekretion angelangt ist. Der Kern ist stark aufgelockert, so dass das Chromatingeruest optisch gut zu isolieren ist. Aus dem Kern ist nur eine Schicht, die etwa 1 — 2μ dick sein duerfte, in der Weise gezeichnet, dass die Einstellung des Mikroskops nicht veraendert und nur jede scharf begrenzte Kontur dargestellt wurde. Es lassen sich die in dieser Schicht liegenden Lininnetztcile erkennen, die immer ein wenig schwaecher gefaerbt sind als die darin eingebetteten Granulationen des Chromatins — in diesem Falle nach Fixierung mit CARNOY-Sublimat und Faerbung des Oxychromatins mit Eisenhaematoxylin. Ein entsprechendes Bild eines Ruhekerns laesst sich in dieser Form nicht darstellen, da der Querschnitt bis auf geringe Zwischenraeume voellig schwarz erscheinen wuerde, so dass eine optische Ebene technisch jedenfalls nicht zu isolieren ist.

c) *Pellicia polyctor*

Ein wesentlich anderes Bild bietet die Druesenzelle von *P. polyctor*. Die Insertion des Duftschuppenstiels dringt nur ein kurzes Stueck in die Zelle hinein (Fig. 8). Es wird nur ein kurzer doppelwandiger Chitinschlauch ausgebildet, der sich aus der Verlaengerung der Wand des Insertionsraumes und aus dem wesentlich duenneren Schuppenstiel zusammensetzt. Basalwaerts oeffnet er sich und ist etwas trichterfoermig erweitert. Er stoesst in einen langen schmalen Sekretsammelraum hinein. Die Wand dieses Raumes besteht aus einer sehr duennen Schicht von modifiziertem Protoplasma, das sich faerberisch durch eine etwas staerkere Affinitaet zu Haematoxylin auszeichnet. Die Innenwand ist nicht glatt, sondern unregelmaessig runzelig. Der Sekretsammelraum durchzieht schlauchfoermig die ganze Zelle, im basalen Teil ist er schwach blasig aufgetrieben. Hierdurch erinnert er an die entsprechende Bildung bei *Sebaldia busirus*. Er wird mantelfoermig von einer Ausleitungszone mit deutlich streifigem Protoplasma umgeben (= Strahlenfigur). Das Zellplasma ist von der gleichen Beschaffenheit wie bei der vorigen Art. Der Kern, von dessen chromatischer Struktur dasselbe wie bei den vorigen beiden Arten auszusagen ist, zeigt eine Aufteilung in zwei seitliche Hauptkoerper, die durch ein bogiges sehr duennes Verbindungsstueck zusammenhaengen, so dass im Querschnitt eine U-foermige Figur erscheint (Fig. 9). Der Sekretsammelraum mit der Ausleitungszone liegt immer innerhalb der Rinne, die von dem Kern eingeschlossen wird.

Bemerkenswert sind die Duftschuppen, die sehr dick sind und von der Basis bis zur Spitze von einem Gittergeruest senkrechtstehender Trabekel durchzogen werden, die im Zentrum des Querschnitts regellos anastomosieren (Fig. 10). Diese Bildung erinnert an die bei *Eriopyga lamptera* (BARTH. 1950) gefundenen Duftschuppen, denen eine grosse kapilare Anzichungskraft zugeschrieben werden muss.

d) *Heliopetes arsalte*

Die Druesenzellen von *Heliopetes arsalte* stellen einen anderen Typ dar. Der Unterschied bezieht sich auf die Gestaltung des Ausleitungsapparates. Die Zelle ist wie beim vorigen Typ ebenfalls zylindrisch gebaut, zwei-bis dreimal so lang wie breit. Der ausleitende Apparat nimmt nur den apikalen Teil der Zelle in Anspruch (Fig. 11, 12 und 13). Er wird von der verlaengerten Insertion der Duftschuppe gebildet, die wie beim vorigem Typ in das Zellinnere versenkt wird. Der Insertionsbecher ist immer stark zur Hinterseite der Apophyse geneigt, so dass der Chitinschlauch, der eine Verlaengerung der exocuticularen Schichten der Auskleidung des Insertionsraumes darstellt, schraeg das Integument durchstoesst und in dieser Richtung in das Zellplasma eindringt. Etwa in der Zellmitte bildet der Chitinschlauch eine Duplikatur, die ringfoermig wie ein breiter Kragen seitlich absteht. Am Ende geht der Schlauch nach einer kurzen zwiebelfoermigen Anschwellung in den Schuppenstiel ueber, der in ihm zur Insertion zuruecklaeuft. Waehrend der Chitinschlauch aus einem relativ dicken, sehr harten Chitin besteht, ist der Schlauch des Schuppenstiels sehr duenn (weniger als 0,2μ).

Das Protoplasma laesst um den basalen Teil des Chitinschlauches einen grossen Hohlraum frei, der als Sekretsammelraum zu werten ist (RE). Der ringfoermige Kragen des Schlauches bildet das Dach dieses Hohlraums, die Muendung des Schuppenstiels liegt etwa in der Mitte des Hohlraums, dessen Wandung immer scharf abgegrenzt ist, aber in keinem Fall aus Cuticularmasse gebildet wird, sondern lediglich eine Grenzschicht des Protoplasmas ist. Schalenfoermig wird der Sekretraum von einer streifigen Protoplasmazone (Strahlenfigur, Ausleitungszone) umgeben. Im basalen Zellteil ist eine weitere, ergastoplasmatische Streifenzone ausgebildet, die senkrecht auf der Basalflaeche und damit senkrecht auf der kraeftigen Basalmembran steht.

Im basalen Teil, im Anschluss an das Ergastoplasma, zeigt das Protoplasma der Zellen in der Sekretionsphase kleinere deutlich begrenzte Vakuolen, die an Groesse in Richtung zur Ausleitungszone durch Zusammenfliessen laufend zunehmen, jedoch nie zu grossen Sammelvakuolen anwachsen. In Ruhestadien ist das Protoplasma sehr dicht, homogen und sehr feinkoernig. Nach Osmiumfixierung wird im basalen Teil eine staerkere Granulation fixiert. Die Vakuolen sind immer leer, nur nach Fixierug mit Os O_4 liess sich ein geschwaerztes Sekret nachweisen. Dagegen ist in den Sekretsammelraeumen mit jedem der oben genannten Fixadoren ein Sekret zu faellen, das faerberisch eine sehr starke acidophile Reaktion zeigt. Dieser Befund ist von besonderem Interesse fuer unsere Kenntnisse ueber den Sekretionsvorgang, da aus ihm hervorgeht, dass das Sekret in den Plasmavakuolen ein anderer als der im Sekretsammelraum gefundene Koerper ist. Ob dieser Unterschied chemischer oder rein physikalischer Natur ist, laesst sich nicht entscheiden. Die Verwandlung der einen in die andere Substanz kann einerseits in der Ausleitungszone oder beim Durchtritt durch die Grenzschicht vor sich gehen oder aber andererseits als Quellungs-oder Entquellungsvorgang im Sekretsammelraum stattfinden. Ueber den Agregatzustand des Sekrets laesst sich nichts Bestimmtes aussagen, es ist lediglich zu vermuten, dass er fluessig ist, da das Sekret durch den sehr duennen Schuppenstiel in den Schuppenhohlraum fliessen muss, um zur Verdunstung zu gelangen. Waehrend in der Ruhephase die Faeden der Ausleitungszone eng aneinander und parallel liegen (entsprechend dieser Zone in Fig. 1), sind sie in der aktiven

Phase stark aufgelockert und verbogen, so dass zwischen ihnen Hohlraeume entstehen (entsprechend Fig. 11).

Der Kern liegt immer basalwaerts von der Ausleitungsfigur. Er ist in der Laengsachse der Zelle eliptisch gestreckt (Fig. 11). In den Randzellen der Druesenfelder ist er asymmetrisch, der Asymmetrie dieser Zellen angepasst. (Fig. 14 b und c). Sein Basalrand ist regelmaessig gerundet, waehrend der Apikalrand immer in Hoecker und Zaehne auslaeuft, die wohl der oben fuer *Sebaldia busirus* geschilderten Vergroesserung der Oberflaeche dienen (Fig. 14 e). Das Chromatin in Kernen aktiver und ruhender Druesenzellen durchlaeuft denselben Wechsel wie bereits oben mitgeteilt. In Fig. 11 ist ein aktiver Kern dargestellt, von dem im apikalen Teil ein kappenfoermiges Stueck abgeschnitten ist, so dass der Nukleolus deutlich sichtbar ist.

Wie bei den bereits beschriebenen Zellen sind Hypodermiszellen und tormogene Zellen unter der Cuticula erhalten (Fig. 8, 9, 11 und 12 TG).

e) *Hesperia syrichtus*

In der Druesenzelle von *Herperia syrichtus* findet sich derselbe Typ wie bei der vorhergehenden Art; die Form der Zellen ist nicht mehr zylindrisch langgestreckt, sondern breiter als lang (Fig. 15 und 17). Ausserdem sind sie bei etwa gleicher Faltergroesse viel kleiner. Der Ausleitungsapparat liegt nicht mehr zentral im apikalen Teil der Zelle, sondern nimmt eine Haelfte von ihr ein, so dass sie einen asymmetrischen Anblick bietet. Die Insertion, an der die tormogene und die Hypodermiszellen zu finden sind, und der Ausleitungsapparat sind in derselben Weise gebaut wie bei *Heliopetes arsalte*, nur dass die Neigung des Insertionskanals geringer ist. In der flachen Zelle stoesst der Ausleitungsapparat fast bis an die basale Flaeche mit der Basalmembran. Der ringfoermige cuticulare Kragen, der auch hier das Dach des Sekretsammelraumes bildet, ist in seinem Anfang verstaerkt und bildet eine ringfoermige Rinne nahe dem Chitinschlauch. An der Oeffnung des Schuppenstiels findet sich keine Erweiterung wie bei der vorigen Art. (Fig. 16). Waehrend die protoplasmatische Ausleitungszone gut sichtbar mit deutlichen Plasmafaeden ausgebildet ist, laesst sich die ergastoplasmatische Zone nur unscharf erkennen. Die Veraenderungen im Protoplasma und Kern waehrend der Sekretionsphasen sind die naemlichen wie bei *Heliopetes arsalte*. In Fig. 15 ist links ein Kern gezeichnet, der genau in der Mitte laengs durchschnitten ins. Die Kernraender zeigen keine Erhoehungen und Zaehne wie bei der vorigen Art, doch tritt auch hier eine Oberflaechenvergroesserung ein in Form einer mehr oder weniger langen schlauchfoermigen Erweiterung des basalen Teils, die immer zu der Ausleitungszone umgebogen ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Druesenzellen der Apophysen des Metathorax der Maennchen einiger brasilianischer Hesperiden dargestellt. Die Apopysen beherbergen Duftdruesen, die im ersten Teil dieser Arbeit (Barth, 1) erstmalig morphologisch beschrieben wurden. Die Druese ist ein Komplexorgan mit einem druesigen Teil in den genannten Apophysen und einem verdun-

stenden Teil in Form eines Borstenpinsels an der Hintertibie. Die Druesenflaeche einer Apophyse setzt sich aus einzelligen, selbstaendigen Druesenelementen zusammen, die ihr Sekret durch jeweils eine Duftschuppe ausleiten und auf ihr verdunsten lassen. Die Druesenzelle entspricht der trichogenen Zelle der Duftschuppe. Die Hauptteile der Druesenzelle sind:

a) sezernierender Plasmakoerper mit typischen cytologischen Veraenderungen waehrend der Ruhe-und Sekretionsphase, mit ergastoplasmatischer Basalzone und einer ebensolchen Ausleitungszone, die einen Sekretsammelraum einschliesst;

b) Kern, der entsprechend dem trophischen Wechselspiel zwischen Kern und Protoplasma eine Vergroesserung der Oberflaeche erfahren hat und waehrend der Sekretionsphasen charakteristische Veraenderungen durchlaeuft. Die Kerne sind extrem polymorph;

c) Ausleitungsapparat, der in jedem Falle von der Insertion der Schuppe gebildet wird und damit chitiger Natur ist. In Bezug auf den Ausleitungsapparat werden zwei Druesentypen unterschieden:

1. grosse Zellen mit stark verlaengertem Kanalsystem, das die ganze Zelle durchlaeuft;

2. kleine Zellen mit kuerzerem Ausleitungsapparat, der nur in den apikalen Zellteil eindringt, bezw, nur eine Zellhaelfte der in diesem Falle asymmetrischen Zelle einnimmt.

Der erste Typ findet sich bei Arten, die nur diesen Apparat als Duftorgan besitzen, waehrend der zweite Typ bei Formen gefunden wird, die ausser den Apophysendruesen noch einen ebenfalls als Duftreinrichtung gedeuteten Constalumschlag tragen.

Zur Beschreibung gelangen die Druesen von: *Sebaldia busirus, Pellicia bromias und polyctor, Heliopetes arsalte* und *Hesperia syrichtus*.

Es werden verschiedene Funktionsstadien der Druesenzellen beschrieben, wobei die Kern-Plasma-Korrelation besonders deutlich in den grosszelligen Druesen von *Sebaldia busirus* und *Pellicia bromias* zum Ausdruck kommt. Waehrend der Sekretbildung waechst der Kern bedeutend durch Aufnahme von Fluessigkeit. Das Chromatin wird nicht vermehrt. Waehrend des Sekretausstosses aus dem Zellplasma gibt der Kern bedeutende Mengen fluessiger Substanzen ab, die wahrscheinlich katalysatorartig wirkende Regeneratoren fuer die Wiederherstellung der urspruenglichen Plasmastruktur darstellen. Diese trophische Wechselwirkung zwischen Kern und Plasma ist sowohl an den grosskernigen, wie an den kleinkernigen Zellen zu beobachten.

SUMMARY

The gland cells of the metathoracic apophyses of some Brazilian *Hesperidae* are descrived.

The apophyses possess scent glands which were firstly descrived in the morphological part of this study (Barth, 1). The gland represents a complex organ with a glandular part hidden in the mentioned apophyses, and with an evaporating part formed by a brush of bristles on the hind tibia. The

gland surface of an apophyse is composed of unicellular and independent gland elements leading out their excretion each by means of a scent scale. The liquid apears on the surface of the scale for evaporation. The gland cells correspond to the trichogenic cells of the scent scales. The principal parts of each gland cell are :

a) a secreting protoplasmic body with typical cytological alterations during the inactive and active phases, with an ergastoplasmic basal zone and a conduct apparatus of just the same material including a cavity for storage;

b) a nucleus which, corresponding to the trophic correlation between nucleus and protoplasm, suffered an increasing of its surface and which runs through typical alterations during the phase of activity. The nuclei are extremly polymorphic.

c) a conduct apparatus which in every case is formed by the insertion socket of the scale and, in consequence, is of cuticular nature. With regard to the conduct apparatus two types of glands are descrived:

1. large cells with a prolongated duct system running through the whole cell;

2. small cells with a shorter duct apparatus entering the apical part of the cell to occupy only one half of it, the cell thus becoming asymmetrical.

The first type is found in species which possess only this apparatus as a scent organ, while the second one occurs in species which, in addition to the glands in the apophyses, have one more scent aparatus formed by a costal fold. This paper deals with the following species: *Sebaldia busirus, Pellicia bromias, Pellicia polyctor, Heliopetes arsalte* and *Hesperia syrichtus*.

Different phases of function of the gland cells are descrived. The correlation between the nucleus and the protoplasm becomes specially distinct in the glands with big cells, in *Sebaldia busirus* and *Pellicia bromias*. During the formation of the scent material the nucleus grows considerably by taking up fluid substances, while the chromatic mass does not increase. Simultaneous with the expulsion of the liquid out of the protoplasm of the gland cells the nucleus excretes an important quantity of fluid substances which probably represents regenerators which, reacting like catalysatores, restore the original structure of protoplasm.

4. ABKUERZUNGEN IN DEN FIGUREN

EM Basalmembran; CG Chromantingranula; CL Chitinschlauch; CU Cuticula; DS Duftschuppe; EG Ergastoplasma; EW Erweiterung des Ausfuehrkanals; GG Ausfuehrkanal; IB Insertionsbecher; IZ Interzellularraum; KD Druesenzellkern; KM Kernmembran; KR Ringfoermiger Kragen; LG Liningeruest; NL Nukleolus; OE Oeffnung des Schuppenstiels; PL Protoplasma; RE Sekretsammelraum, Reservatorium; RE' Erweiterung des Sekretsammelraumes; RI Rippen; RN Ringfoermige Rinne; SF Ausleitungszone; ST Schuppenstiel; TA Trabekel; TG Tormogene Zelle; TR Trachee; VS Verbindungsstueck des Kerns.

5. LITERATUR

Siehe am Schluss des portugiesischen Teils

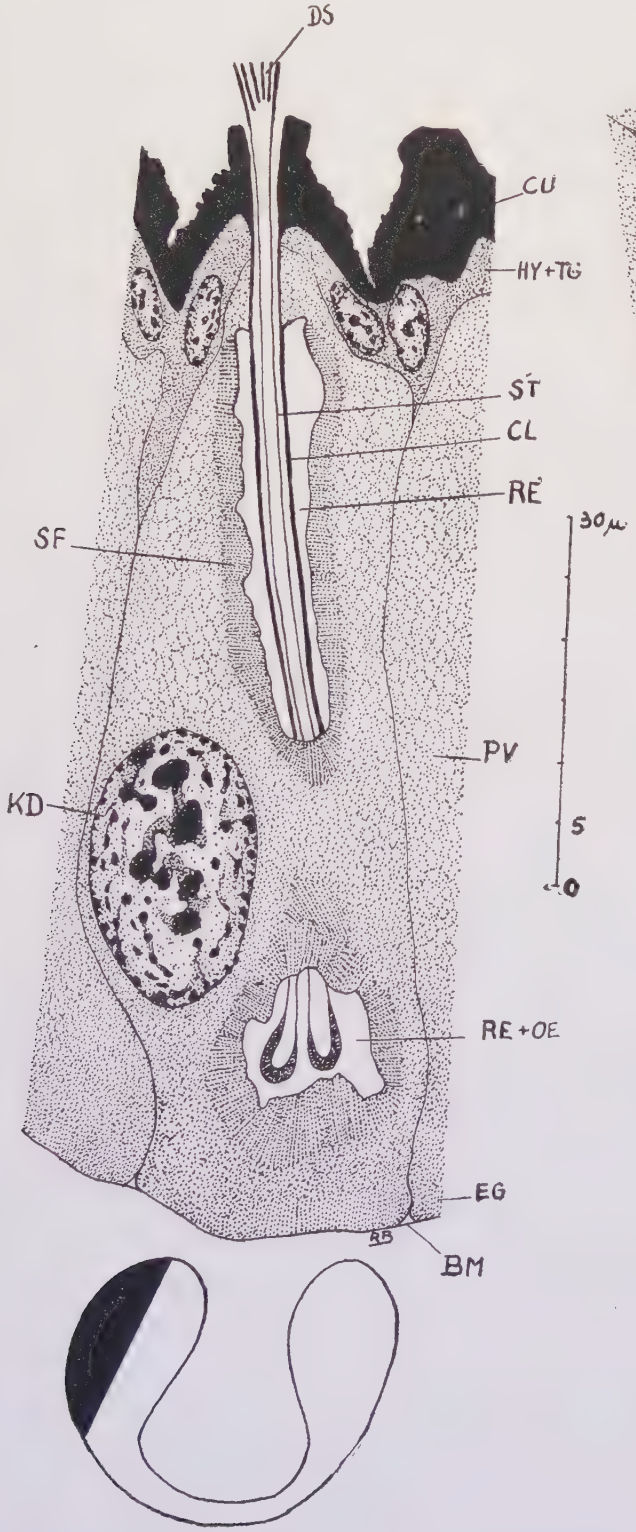


Fig. 1

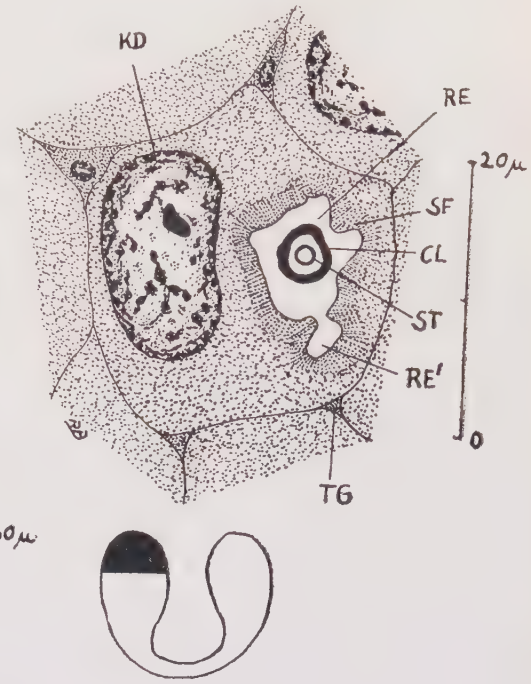


Fig. 2

Fig. 1. Corte longitudinal da célula glandular de *Sebaldia busirus*. Abaixo a indicação da direção do corte do núcleo; desenhada, em preto cheio, a parte representada do núcleo.

Fig. 2. Corte transversal da célula glandular de *Sebaldia busirus* com indicação da direção do corte do núcleo.

Fig. 1. Laengsschnitt durch eine Druesenzelle von *Sebaldia busirus*. Unten Angabe der Richtung des Schnittes durch den Kern dargestellter Teil.

Fig. 2. Querschnitt durch eine Druesenzelle von *Sebaldia busirus* mit. Angabe des Kernschnittes.

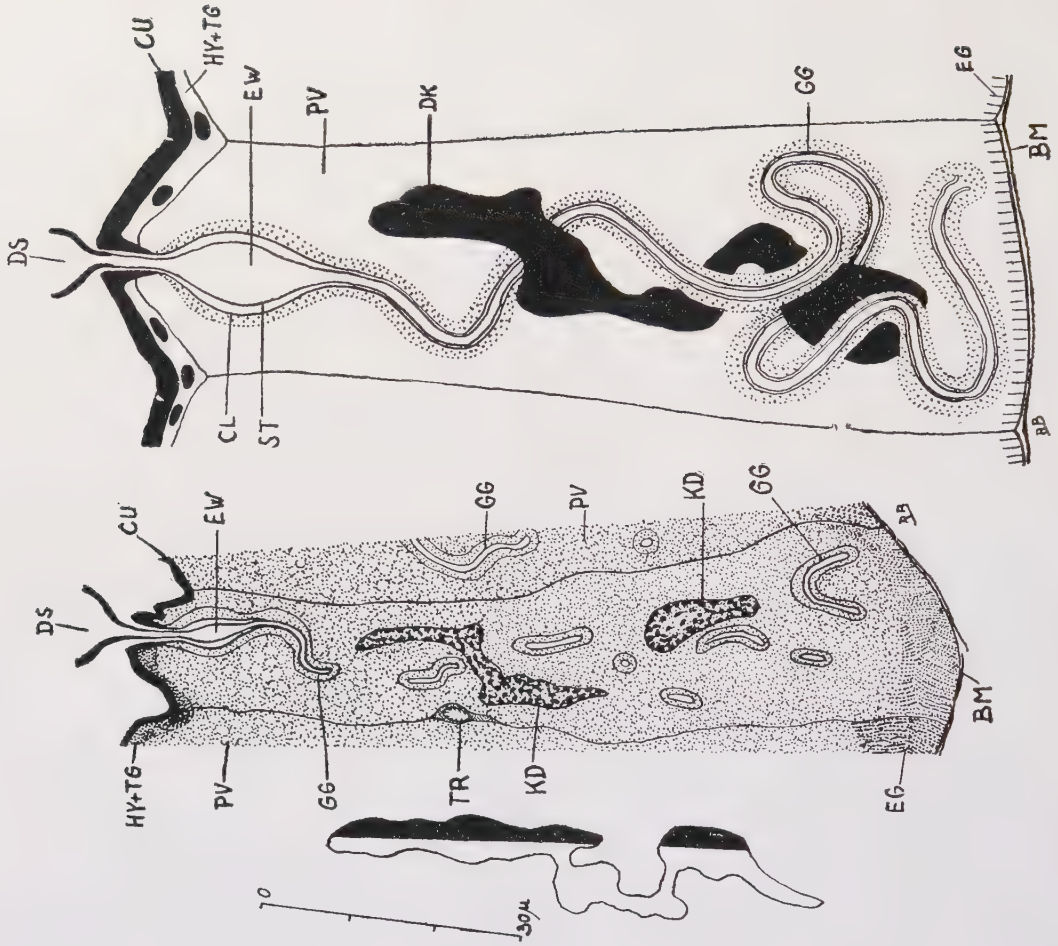


Fig. 6

Fig. 5

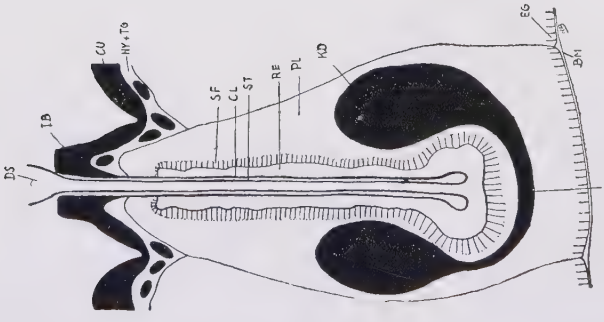


Fig. 3

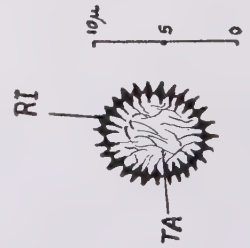


Fig. 4

Fig. 3. Esquema da organização da célula glandular de *Sebaldia busirus*.
Fig. 4. Corte tranversal da cerda condutora de *Sebaldia busirus*.
Fig. 5. Corte longitudinal da célula glandular de *Pellicia bromias* com indicação da direção do corte do núcleo.
Fig. 6. Esquema da organização da célula glandular de *Pellicia bromias*.

Fig. 3. Schema des Aufbaues einer Druesenzelle von *Sebaldia busirus*.
Fig. 4. Querschnitt durch die ausleitende Borste von *Sebaldia busirus*.
Fig. 5. Laengsschnitt durch die Druesenzelle von *Pellicia bromias* mit Angabe des Kernschnittes.
Fig. 6. Schema des Aufbaues einer Druesenzelle von *Pellicia bromias*.

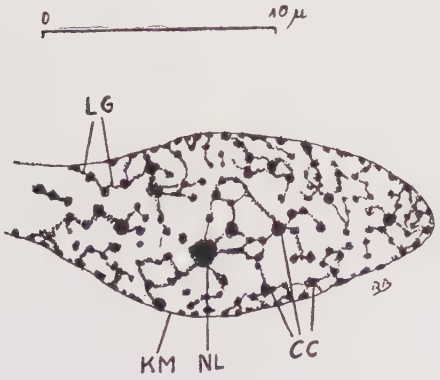


Fig. 7

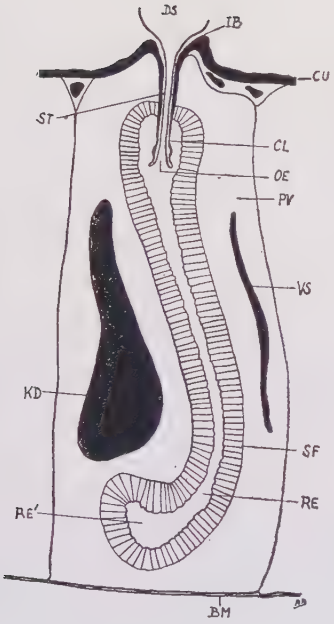


Fig. 8

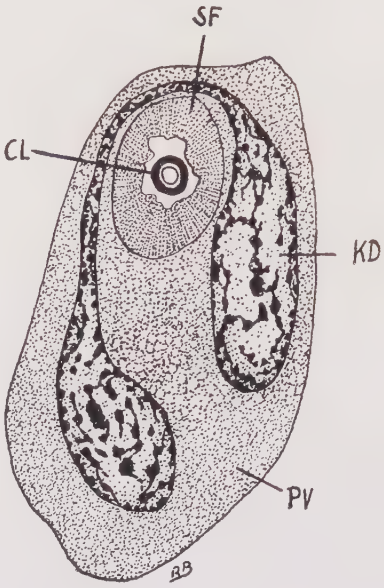


Fig. 9

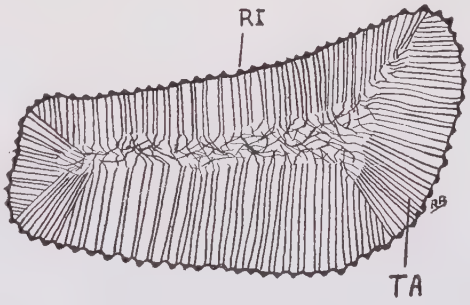


Fig. 10

Fig. 7. Parte basal de um núcleo da glândula de *Pellicia bromias*. Explicações no texto.

Fig. 8. Esquema da organização da célula glandular de *Pellicia polyctor*.

Fig. 9. Parte apical da célula glandular de *Pellicia polyctor* em corte transversal.

Fig. 10. Corte transversal da célula glandular de *Pellicia polyctor*.

Fig. 7. Basaler Teil eines Kernes aus der Druese von *Pellicia bromias*. Erklaerungen siehe Text.

Fig. 8. Schema des Aufbaues einer Drusenzelle von *Pellicia polyctor*.

Fig. 9. Apikaler Teil der Druesenzelle von *Pellicia polyctor*.

Fig. 10. Querschnitt durch eine Druesenzelle von *Pellicia polyctor*.

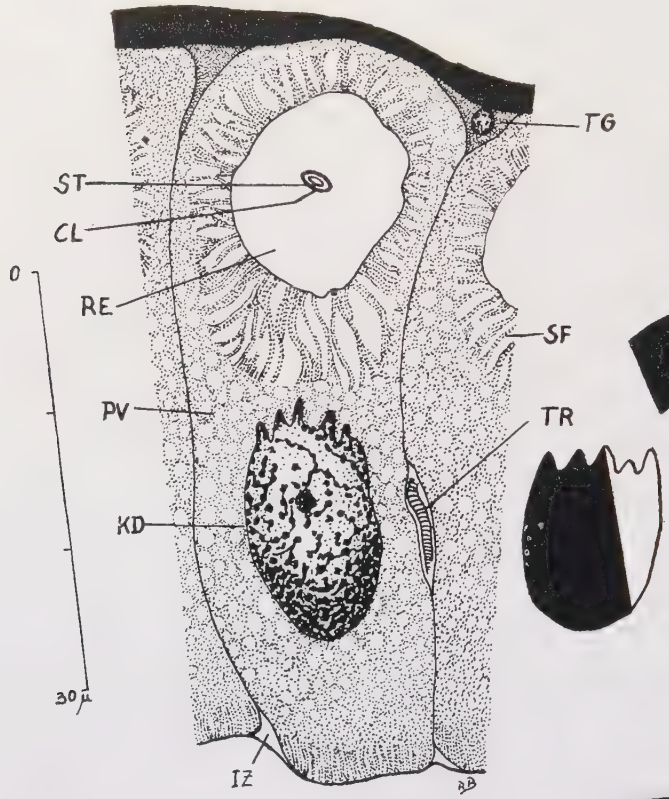


Fig. 11

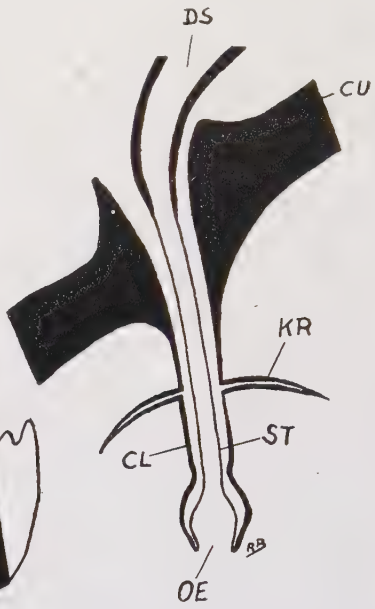


Fig. 12

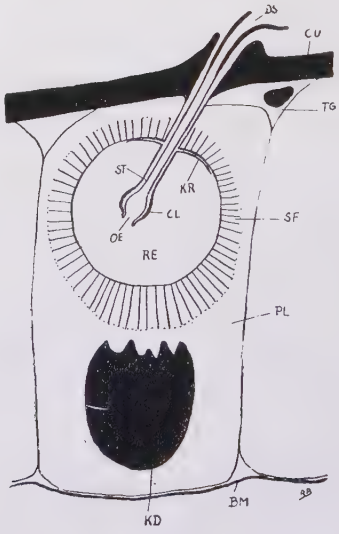


Fig. 13

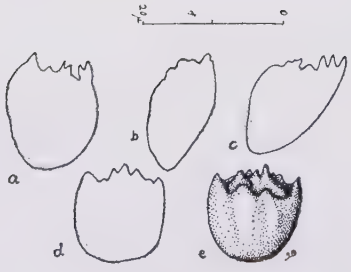


Fig. 14

Fig. 11. Corte longitudinal da célula glandular de *Heliopetes arsalte* com indicação da direção do corte do núcleo.

Fig. 12. Esquema do corte longitudinal das partes quitinosas da célula glandular de *Heliopetes arsalte*.

Fig. 13. Esquema da organização da célula glandular de *Heliopetes arsalte*.

Fig. 11. Laengsschnitt durch die Druesenzelle von *Heliopetes arsalte* mit Angabe des Kernschnittes.

Fig. 12. Schematischer Laengsschnitt durch die chitinigen Teile der Druesenzelle von *Heliopetes arsalte*.

Fig. 13. Schema des Aufbaues einer Druesenzelle von *Heliopetes arsalte*.

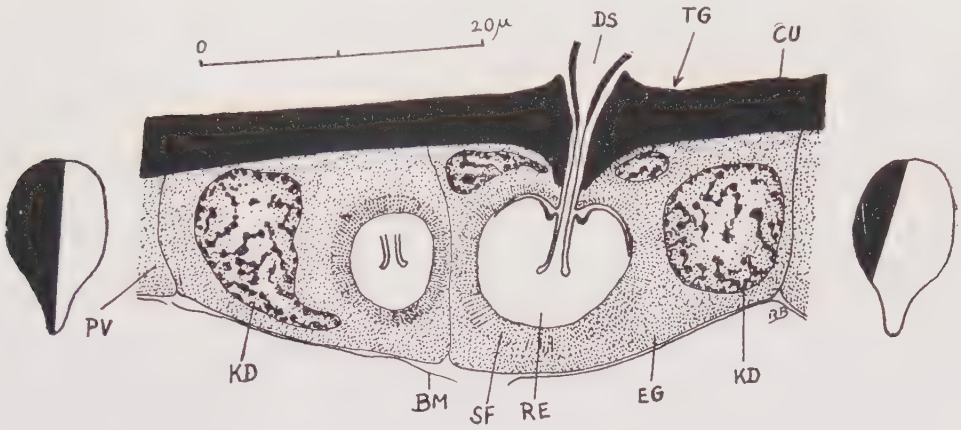


Fig. 15

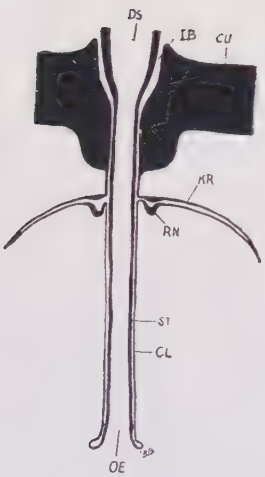


Fig. 16

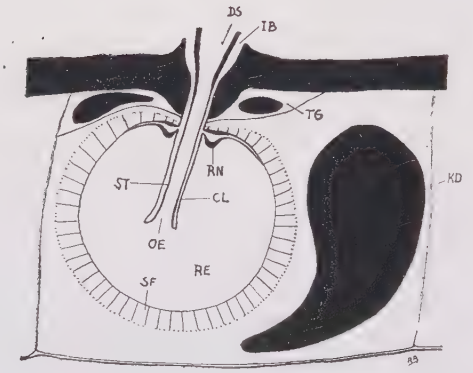


Fig. 17

Fig. 14. Formas de núcleos em células glandulares de *Heliopetes arsalte*.

Fig. 15. Corte longitudinal de duas células glandulares vizinhas de *Hesperia syrichtus* com indicação da direção do corte do núcleo.

Fig. 16. Esquema do corte longitudinal das partes quitinosas da célula glandular de *Hesperia syrichtus*.

Fig. 17. Esquema da organização da célula glandular de *Hesperia syrichtus*.

Fig. 14. Kernformen der Druesenzellen von *Heliopetes arsalte*.

Fig. 15 Laengsschnitt durch zwei benachbarte Druesenzellen von *Hesperia syrichtus* mit Angabe der Kernschnitte.

Fig. 16. Schematischer Laengsschnitt durch die chitinigen Teile der Druesenzelle von *Hesperia syrichtus*.

Fig. 17. Schema des Aufbaues einer Druesenzelle von *Hesperia syrichtus*.

O Órgão Odorífero do Macho de Mocis repanda Fabr., 1794

(Lepidoptera, Noctuidae, Sarrothripinae)

por

Rudolf Barth

(Com 25 figuras)

1. Introdução.
2. Esqueleto do protórax.
3. Área odorífera das coxas anteriores.
4. Função do pincel distribuidor.
5. Tíbias e tarsos posteriores.
6. Escamas odoríferas e pêlos disseminadores.
7. Resumo.
8. Bibliografia.
9. Índices nas figuras.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta do Noctuídeo *Mocis repanda* é uma praga bem conhecida no Brasil prejudicando as Gramíneas, especialmente o milho. O nome popular é "lagarta dos milharais". Na mariposa masculina encontra-se um órgão odorífero até agora não descrito.

Puxando-se, cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça, uma das pernas anteriores para a frente, e, ao mesmo tempo, um pouco para o lado, abre-se na zona pleural do corpo, em direção à cabeça, um grande pincel de pêlos que, inserindo-se numa saliência lateral do protórax, se destaca da escamação entre patágio, tégula e raiz da asa. Os dois pinceis, um de cada lado, quando abertos simultàneamente, transformam o Lepidóptero em um animal de aspecto notável, muito bonito e bizarro. Quanto à parte glandular o estudo dêste órgão, como aparelho odorífero, não trouxe muitos aspectos novos porém, pelo estudo do pincel surgiram tantas particularidades interessantes que ficou plenamente justificado um exame detalhado dêste complexo. Isto é ainda mais necessário pelo fato do órgão apresentar uma formação diferente das dos pinceis de pêlos dos Noctuídeos das Índias, descritos por Eltringham (1937) e, que em parte são classificados como irradiadores odoríferos (por ex. *Crocidolomia binotalis, Remigia frugalis*). Isto quer dizer que os pêlos disseminadores encaminham a secreção das próprias cé-

lulas maternas e a deixam evaporar. Nesta espécie o mecanismo de abertura do pincel é de natureza puramente física, não sendo os pêlos erigidos por meio de músculos como foi descrito por ELTRINGHAM (1937), entre outros, para *Crocidolomia binotalis*, por BARTH (1951) para *Eriopyga lamptera* e por ILLIG (1902) para *Syrichtus malvae*. A posição vertical dos pêlos se verifica por um processo automático pelo deslocamento das coxas para a frente, já acima mencionado. Para a explicação do complicado mecanismo faz-se necessária uma descrição abreviada do esqueleto do protórax, o que é feito no item 2.

Além dos pinceis distribuidores encontra-se, no bordo posterior das da região pleural. É inteiramente sôlto do episterno e está ligado ao último com células glandulares situadas na sua base e, cujas secreções são conduzidas e evaporadas pelas mesmas escamas odoríferas. Êste aparelho pode ser considerado como um aparelho disseminador, enquanto que os tufos de pêlos, acima mencionados, representam pincéis-distribuidores que retiram uma secreção de um outro ponto e a deixam evaporar. As próprias células de formação (maternas) são degeneradas e não têm nenhuma função glandular.

2. ESQUELETO DO PROTÓRAX

O protórax de *Mocis repanda* está modificado tìpicamente para os Lepidópteros. Restou do notum do tergito (fig. 7, TG) apenas uma estreita placa, fixada para trás ao mesotórax por uma grande membrana. Para a frente segue uma parte arqueada que, devido à sua posição e, por outro lado, sendo uma área de inserção dos músculos longitudinais dorsais, pode ser identificada como o acrotergito (AT) com o fragma dos segmentos alados. Na região pleural encontra-se o episterno (ES) fortemente evoluido inserindo-se no acrotergito por uma sutura comprida. No lado ventral está situada uma pequena parte do esqueleto no fim da qual encontra-se a articulação anterior (secundária) da coxa. Assim, esta parte é identificada como o trocantino (TS). Na parte inferior do bordo interno do episterno insere-se, por meio de uma sutura também comprida, o esterno fortemente modificado (MST). A modificação é provocada por um processo de dobramento e abaixamento de grandes partes do esterno para dentro da cavidade do tórax, sendo êste processo chamado criptosternia. Porém, em *Mocis repanda* esta criptosternia ainda não tem uma evolução tão perfeita como no grupo das *Rhopalocera*. Isto porque ainda é encontrada, na metade anterior dos mesotórax e metatórax, uma parte larga do esqueleto. Esta parte relativamente grande do esterno emite para a frente um processo estreito que se aumenta e vai formar dois prolongamentos cuticulares em forma de T (PST). Estes dois braços circundam o foramen occipitalis e estão ligados para a frente com a margem do mesmo e para trás com os acroesternito, epiesternito e mesoesternito por meio de áreas membranosas distendidas. Êste dispositivo corresponde ao "jugulare" de BERLESE e pode-se considerar como o proesternito. O setor posterior do esternito é deslocado, em sua maior parte, para o interior do tórax de modo que restam apenas duas porções pequenas (postesternito e interesternito, OST, IST na fig. 2). Estas partes (E_1 e E_2) indicam o eixo longitudinal ventral do protórax e possuem estreitas pontes cuticulares ligando-as entre si, com o mesoesternito e, por uma tira em forma de *V*, com o proesternito do mesotórax. Nas extremidades dos abaixamentos

da cavidade toráxica inserem-se alguns músculos longitudinais ventrais (LMU). A maior parte da área, do lado de fóra do protórax, é membranosa.

Mais uma outra modificação foi verificada no epímero (VA na fig. 1) da região pleural. É inteiramente sôlto do episterno e está ligado ao ultimo por uma membrana distendida, não tendo ligação alguma com o tergito, no lado dorsal. Êle representa um braço livre (braço-distribuidor) incluido na membrana pleural e formando, com a sua extremidade ventral, a articulação dorsal primitiva da coxa (dHG na fig. 3). A extremidade apical e ao mesmo tempo dorsal, apresenta um alargamento em forma de uma colher (LO) em cuja parte côncava, que em repouso está virada para trás, se inserem as cerdas do pincel-distribuidor (veja abaixo VP). O braço (VA) possui um bordo anterior reforçado (VR na fig. 4) e uma expansão em forma de folha (BE). Um pouco abaixo da metade, articula-se uma alavanca quitinosa fina (CH), por uma parte arqueada, e que percorre a membrana pleural num sentido ligeiramente curvado atingindo a ponte quitinosa (CD na fig. 3), entre postesternito e interesternito, onde se insere com a outra extremidade em forma de gancho. A grande membrana, em redor do braço-distribuidor e da alavanca quitinosa, forma uma dobra profunda (MF) cobrindo o braço e a alavanca, quando em repouso. Na preparação descamada só se pode ver uma pequena parte do pincel-distribuidor, no início da grande dobra da membrana. Todo o aparelho está escondido, quando em repouso, pela densa escamação.

3. ÁREA ODORÍFERA DAS COXAS ANTERIORES

A parte glandular do aparelho odorífero está situada no lado posterior das coxas que são quase triangulares, em corte transversal (figs. 3 e 5). Tôda a área do lado posterior, além das margens estreitas, é tomada por escamas odoríferas (esquema da inserção veja fig. 6) que se ajustam fortemente sôbre a cutícula. Elas são cercadas nas margens por franjas compridas de escamas e pêlos. Contam-se por 1 mm^2 quase 1.325 inserções. As escamas odoríferas têm um brilho prateado que as diferencia nìtidamente das outras do revestimento do corpo. Quando em repouso as coxas estão situadas para trás de modo que as áreas posteriores se encostam às membranas terminais do protórax, que possui a tira em forma de *V*, e na parte esternal do mesotórax. Estas duas últimas partes são nuas e têm, especialmente nos bordos e também nas suturas, escamas grandes e bem afastadas. Em material sêco e mais antigo estas escamas, bem como as odoriferas, aderem firmemente ao instrumento com que forem tocadas. Em virtude desta substância colaginosa, é difícil isolar as duas formas citadas de escamas. Pode-se observar em ambas, como também na cutícula nua, um brilho úmido, nas mariposas vivas ou recentemente sacrificadas e das quais o pincel tenha sido retirado. Êste, em repouso, se encontra escondido entre coxa e corpo do tórax de modo a atingir a área cuticular nua com as extremidades de seus pêlos. Ao mesmo tempo está coberto pelos pêlos compridos do bordo externo da asa.

A exceção de faixas laterais estreitas (SR), representados em corte transversal (figs. 5 e 7), tôda a hipoderme do lado posterior (HS) da coxa é glandular. Além dos dois músculos do trocanter — dos quais o *musculus*

adductor (MU_1) possui um tendão forte equanto que o *musculus abductor* (MU_2) o tem curto e pouco antes da articulação, só encontramos na coxa o nervo da perna (NB) e dois espaços sanguíneos.

A cavidade da coxa é dividida por um diafragma bem visível em dois espaços quase iguais. O diafragma se insere perto dos ângulos internos e externos da coxa. Na parte posterior, em corte transversal, encontram-se o *musculus abductor trochanteri* (MU_2) e o nervo da perna, na parte anterior o músculo antagônico e numerosas traquéias bem aumentadas (TR), enchendo quase toda a cavidade e só deixando um pequeno espaço para o líquido da cavidade do corpo, perto do músculo. Aliás, a parte posterior está cheia do mesmo líquido. A cutícula apresenta, do lado posterior, as inserções das escamas odoríferas. A fig. 7 mostra um setor da área glandular, fortemente aumentado. A forma da célula glandular é cúbica e ela enche, com o seu citoplasma, uma parte do canal da inserção da escama. O núcleo da célula forma um elipsóide regular e possui cromatina esparsa. O citoplasma correspondente à fase secretora é mais ou menos cheio de vacúolos muito pequenos. Não se pode observar um aparelho excretor. Em redor do orifício do pedúnculo da escama é encontrada uma pequena cavidade no citoplasma (SR na fig. 7) podendo ser denominada de reservatório. A inserção da escama é simples e corresponde ao esquema apresentado na fig. 8. A membrana de inserção é comprida e atinge até ao fim do pedúnculo da escama (só visível em luz polarisada). Além das células glandulares encontram-se alguns núcleos pequenos, nesta parte do citoplasma, provàvelmente, podendo ser relacionados com os núcleos das células tormogêneas. Apesar de ser comprida a membrana de inserção, a escama não se pode deslocar, pois o aumento do seu pedúnculo evita um movimento de saida.

4. FUNÇÃO DO PINCEL-DISTRIBUIDOR

Enquanto que a parte glandular do aparelho odorífero tem construção muito simples encontram-se, na análise da função do pincel-distribuidor, grandes dificuldades quanto ao mecanismo da abertura. Na fig. 9 são apresentadas as duas fases finais do movimento de abertura, sendo a fig. 9b igual à fig. 3. Na fig. 9a foi desenhada a posição em repouso, mas a coxa foi um pouco levantada a fim de tornar visível a alavanca quitinosa (CH) que, naquela posição, estava escondida pela coxa. Esta alavanca se insere de forma móvel na ponte quitinosa estreita, entre os postesternito e interesternito do protórax. Na outra extremidade ela se articula no braço do pincel-distribuidor (epímeron) de maneira que ela atravessa a espansão em forma de folha do braço e se insere no bordo anterior reforçado do mesmo, correspondendo à fig. 4b. A articulação entre coxa e braço (articulação dorsal e primária da coxa, dHG) está situada no bordo posterior deste e, para onde se dirige o bordo anterior reforçado. Êste alarga-se na extremidade anterior. No seu lado interno, agora côncavo, encontram-se as cerdas do pincel. Estas (veja abaixo) se inserem muito densamente, tendo 1 mm^2 aproximadamente 6.200 inserções. Estão situadas tão juntas que a parede de uma inserção encontra à da vizinha (fig. 10 e 11a).

No movimento da coxa, inicialmente mencionado, para a frente e um pouco para o lado (veja a seta na fig. 9a), a articulação coxa-dorsal também é deslocada para a frente descrevendo um arco circular curto, pois a articulação coxal secundária (antigamente ventral, agora situada no lado anterior

da coxa) permanece na sua posição devido à rigidez da parte chamada epiesterno-trocantino. Mas, sendo o braço fixado na parte central, pela alavanca quitinosa, esta última articulação funciona como ponto giratório. Entretanto, não resulta um efeito de alavanca simples, pois o ponto giratório e a articulação coxo-ventral não estão situados no mesmo eixo longitudinal do braço, ficando o primeiro por cima e a última por baixo do mesmo. Como consequência surge um movimento rotatório, em forma de espiral, em tôrno do eixo longitudinal ocorrendo, ao mesmo tempo, um movimento da extremidade do braço do pincel-distribuidor, para trás. Dêste modo o pincel é levantado da dobra membranosa e a parte final do seu braço, em forma de colher, gira aproximadamente 180° de modo que a sua cavidade, com o feixe de cerdas, é voltada para a frente. Mas êste movimento ainda não terminou: na membrana, que reveste a parte convexa da "colher" (figs. 17a — d), quando em repouso e, que apresenta apenas pequenas e poucas dobras, nasce uma tensão na região que fica voltada para frente durante o movimento. Esta tensão puxa a região indicada para trás tendo o bordo anterior do braço reforçado, a força necessária capaz de girar a cavidade para a frente, invertendo-a. Esta tensão, que surgiu dentro da cavidade pode-se exercer graças às dobras profundas que existem entre as inserções das cerdas (fig. 11). Como consequência as cerdas do pincel-distribuidor se levantam e ficam em posição vertical, sôbre a cutícula, do lado convexo, anteriormente côncavo. O fechamento do pincel é executado por um processo de movimentos idênticos mas o mecanismo se dando em sentido inverso.

5. TÍBIAS E TARSOS POSTERIORES

Enquanto a glândula toráxica representa um órgão complexo, com área glandular e pincel-distribuidor bem separados, o aparelho das pernas posteriores aparece como um orgão simples no qual as escamas odoríferas conduzem a secreção das próprias células glandulares e a deixam evaporar. ELTRINGHAM (1937) menciona para *Remigia frugalis*: "... and the hindlegs are of rather unusual form, being evenly fringed with scales throughout their entire length, reminding one of the swimming legs of some aquatic insects". E' pena que êle não tenha tratado da estrutura das pernas traseiras com mais minúcias, o que não permitiu comparar a espécie de ELTRINGHAM com *Mocis repanda*. Esta apresenta a mesma formação na perna posterior (fig.. 15). A aresta posterior, do fim da tíbia, que começa aproximadamente na altura do primeiro par de esporões, bem como as de todos os 5 artículos do tarso, possuem uma única franja de escamas, com pontas em forma de colher (veja abaixo) de modo que a perna realmente mostra uma semelhança com a do tipo nadadora de um inseto aquático. Os diâmetros dos artículos do tarso, no macho, são um pouco maiores que os da fêmea, numa proporção de quase 1,8 : 1.

Em corte transversal encontra-se uma traquéia fortemente aumentada enchendo quase inteiramente o espaço nos segmentos tarsais (fig. 14a). A parte anterior, em corte transversal, separada por um diafragma bem desenvolvido, forma um espaço sanguíneo no qual estão situados os nervo e tendão dos *musculi abductores tarsi*, muito pequenos. Os últimos inserem-se no interior da tíbia. Na parte posterior, a traquéia permite a circulação do líquido do corpo (pontilhado na fig. 14a, em corte transversal). A hipoderme neste

ponto se tornou glandular; à cada célula glandular pertence uma das escamas odoríferas acima mencionadas. As células são menores do que as da área glandular da coxa mas, apresentam a mesma estrutura e penetram com um prolongamento na inserção da escama odorífera. A implantação é simples e possui um canal cilindriforme ou apenas fracamente alargado (fig. 14b). Ao contrário, na coxa, as margens da cavidade de inserção são fortemente desenvolvidas. A base do pedúnculo da escama é de fixação simples na parede do canal. Sendo a inserção bem profunda resulta uma implantação bem rígida das escamas de modo a ter-se a impressão de uma escova.

6. ESCAMAS ODORÍFERAS E PÊLOS DISSEMINADORES

Escamas odoríferas da coxa

A forma das escamas odoríferas da coxa (figs. 15a — d) é muito variável. Geralmente têm bordos paralelos mas, a proporção entre comprimento e largura varia consideràvelmente. Existem formas compridas e estreitas no centro da área odorífera (fig. 15d) e curtas e largas na parte basal (fig. 15c). Destas escamas, mais ou menos simétricas, destacam-se as dos bordos da área pela sua assimetria (figs. 15a e b). Elas, vistas de cima, mostram sempre umas dobras longitudinais e numerosas estrias, as quais são baixas e não têm ligações transversais. Encontram-se, para cada 100 micra de largura, normalmente, quase 130 estrias. As medidas das escamas oscilam entre 230 x 20 e 150 x 50 micra. Chama a atenção a estrutura mais fina das estrias: em corte transversal (fig. 16) as paredes das escamas aparecem muito grossas, não se podendo notar trabéculas. Na parte basal a cavidade forma apenas um canal (os números seguintes referem-se à fig. 16) de largura variável (1, 2). Depois que a escama atinge a largura definitiva o canal divide-se em dois (4, 5, 6, 7) ou em 3 (9) ramos. Perto da extremidade as cavidades aproximam-se mais e mais da superfície (10, 11). A estrutura da quitina da escama forma uma tela fina, esponjosa, constituida por lamelas e fios quitinosos de direção irregular, dos quais é de se supôr tratar-se de micelas grandes ou conglomerados de micelas. As escamas odoríferas não possuem nenhum orifício. Crê-se que a secreção atravessa a quitina esponjosa e a lamela superior da escama, penetrando na última por difusão. Depois a secreção se espalha em cima da escama e é retirada pelo pincel-distribuidor, que se deita sôbre a área odorífera.

Escamas odoríferas da perna posterior

As escamas odoríferas são inseridas densamente nas arestas posteriores da tíbia e do tarso, formando uma escova dirigida para trás. A sua forma é a de uma colher com um cabo comprido. O comprimento deste pedúnculo, com uma largura de quase 15 micra, é de 1,7 mm nas formas maiores, e de até quase 0,3 mm nas formas menores; as extremidades, em forma de colher apresentam sempre as mesmas medidas: 250 micra de comprimento e 100 micra de largura. Às vêzes encontram-se formas estreitas com 250 micra de comprimento por apenas 45 micra de largura. O comprimento total da escama odorífera oscila, assim, consideràvelmente entre 1,95 e 0,55 mm.

As estruturas mais finas da escama são notáveis. Nos cortes transversais, representados nas figuras 14d, 14c, 17, 18 podem-se notar as duas lamelas muito finas (OL e UL) que, por meio de numerosas trabéculas e feixes de trabéculas são mantidas equidistantes, distância que, aliás, é muito pequena. Os cortes transversais das estrias demonstram distâncias variáveis. Olhando-se de cima (figs. 14c e 19) a área da escama em forma de colher, observa-se que as estrias correm irregularmente, sôbre as duas lamelas da escama, formando linhas, bem curvadas, com uma distância variável, de forma que as estrias vizinhas nunca se atingem. Em direção à ponta (fig. 19) elas se aproximam entre si sem porém nunca se fundir. A crista das estrias é tomada por pequenas escamas dirigidas para a extremidade apical com uma posição muito regular e constante (fig. 19 nas margens, fig. $14c_1$ esquemático). As pequenas escamas, com quase 0,86 micra de comprimento, 0,26 micra de largura e 0,08 micra de espessura, são inclinadas como se pode ver no esquema da fig. $14c_1$, formando com a crista um ângulo de 25 — 26°, cobrindo umas às outras, em forma de telhas. São fixadas por 5 a 6 trabéculas distanciadas de 0,08 micra entre si. Sendo a ponta das pequenas escamas curvada para baixo, a distância entre duas escamas diminui até 0,03 micra na extremidade apical. As trabéculas encontram-se apenas na parte basal distribuindo-se regularmente em 0,6 micra do comprimento, logo as pontas das escamas ficam livres e, vistas de lado, aparentam dentes. Tornaram-se nìtidamente visíveis as partes mais grossas da estrutura micelar pelo grande poder de resolução do microscópio eletrônico. São as mesmas formações que GENTIL (1951) apresenta em escamas brilhantes do tipo de *Morpho* e que são reproduzidas nas figs. 20 e 23 em escamas da mesma espécie (foto de H. MUTH).

Entre as estrias não se encontram conectivos. A membrana que liga as estrias das lamelas superior e inferior, não possui perfurações e não é uniforme. Ao microscópio eletrônico aparecem (figs. 19 e 21) estruturas transversais muito finas e regulares na membrana das duas lamelas. Na membrana formam listas quitinosas que partem das estrias, sempre com um mesmo ângulo de 45°, para trás. Na metade entre duas estrias tomam a direção de 90° para a frente formando novamente com a estria vizinha um ângulo de 45°. Sendo a profundidade de foco do microscópio eletrônico muito grande aparecem, além das estrias das duas lamelas e das estruturas transversais da lamela superior, também as da lamela inferior formando assim, pelas estruturas cruzadas, a amostra rombiforme das figuras 19 e 21 dando a impressão de uma filigrana fina e delicada. Por se encontrarem, na fig. 21, em baixo e à esquerda, as duas estruturas transversais de ambos os lados, uma em cima da outra, correndo paralelamente, não se pode formar êste aspecto. Cobrindo a amostra rombiforme encontram-se, entre as estrias, as estruturas escuras das trabéculas. A espessura das estruturas desta tela fina das lamelas superior e inferior é muito pequena, em 2,285 micra contam-se 20, isto é em 1 micron 8,7 fios transversais e o mesmo número de intervalos com uma largura igual à das dos fios. Desta maneira um fio transversal apresenta um diâmetro de 0,057 micra. Pode-se identificar esta formação com a estrutura "em forma de janela" das escamas odoríferas de *Papilio polystictus* descrita por BARTH (1950).

Comparando o número de fios transversais da tela com o das trabéculas que fixam as pequenas escamas das estrias, encontra-se o mesmo número quando se reduz à 1 micron. Pode-se observar, na fig. 19, a correspondência dos elementos, o que leva à conclusão de que os fios transversais representam a continuação das trabéculas entre as pequenas escamas. Desta maneira ha uma concordância entre as estruturas mais finas das estrias e a das lamelas, o que significa que estas estruturas são parte do mesmo sistema micelar.

Escamas do pincel-distribuidor

Estas escamas de 5,35 a 5,41 mm de comprimento são constituidas por pedúnculo comprido, estreito e muito fino, com 10 a 12 micra de largura e de uma parte apical com um comprimento de 1,54 a 1,65 mm e uma largura de 180 a 190 micra. Na última parte as lamelas são ligadas entre si por trabéculas muito curtas de modo que a cavidade fica diminuida (fig. 18). A cavidade do pedúnculo por outro lado, é relativamente grande, com trabéculas compridas que, já na preparação à sêco, são visíveis nitidamente com um aumento de 500 vêzes, como sendo estruturas transversais. Com esta forma elas podem dar a impressão de conectivos (fig. 22).

Como nos disseminadores das pernas posteriores as estrias também percorrem, sob a forma de linhas fortemente curvadas e irregulares, a parte terminal da escama e, menos encurvadas, todo o pedúnculo.

A estrutura mais fina das escamas também apresenta, na crista das estrias, a formação de pequenas escamas, já descritas acima. Mas não se pôde observar a estrutura da tela rombiforme nas membranas, aparecendo, visto de cima, apenas as trabéculas fortemente evoluidas.

7. RESUMO

São descritos os órgãos odoríferos do macho de *Mocis repanda*.

Foram encontrados:

1. Uma área com glândulas odoríferas na coxa anterior com um pincel-distribuidor no epímeron, fortemente modificado. O pincel abre-se automáticamente durante o movimento de deslocação da coxa para a frente.

2. Uma área de glândulas odoríferas nas arestas posteriores das tíbias e de todos os cinco artículos dos tarsos posteriores.

O órgão inicialmente mencionado representa o tipo de um órgão complexo com o pincel-distribuidor inserindo-se fora da área glandular. O outro, é um órgão simples, com escamas disseminadoras, que deixam evaporar a secreção das próprias células maternas.

Por meio de observações com o microscópio eletrônico são descritas estruturas finas das escamas irradiadoras e distribuidoras formadas por micelas, até agora desconhecidas. As membranas das escamas disseminadoras, òticamente homogêneas, apresentam, ao microscópio eletrônico fios transversais,

muito finos, com um diâmetro de apenas 0,057 micra. As estrias de ambas as formas de escamas são compostas de finas escamas cobrindo-se umas às outras, com a disposição de telhas. Elas são fixadas por trabéculas guardando uma distância uniforme entre si.

8. BIBLIOGRAFIA

Barth, R.,

1950. Die maennlichen Duftorgane von *Papilio polystictus Btlr.* und *proneus Hbn.* (*Lepidoptera*).
Rev. de Entomologia, **21**: 513-535, 16 figs.

Barth, R.,

1951. O órgão odorífero de um macho do gênero *Eriopyga* (*Lepidoptera, Noctuidae, Hadeninae*).
Memórias do Inst. Oswaldo Cruz, **49**: 599-640, 14 figs.

Berlese, A.,

1909. Gli inseti, Milano 1909, Vol. I.: pg. 550.

Eltringham, H.,

1937. On some secondary sexual characters in the males of certain Indian moths. Trans. Entom. Soc. London, **86**: 135-150, 3 ests.

Illig, K. G.,

1902. Duftorgane der maennlichen Schmetterlinge, Zoologica, **38**: 1-34, ests. 1-5.

Lippert, W. und Gentil K.,

1952. Elektronenmikroskopische Studien ueber micellare Strukturen bei Schmetterlingsschuppen von Morphotyp, Ztscht. f. wiss. Mikr. u Techniú, **61**: 95-100, 5 figs.

9. ABREVIAÇÕES NAS FIGURAS

AT Acrotergito; BE Expansão em forma de folha; BM Membrana basal; BO Cerda da aresta posterior do tarso; CB Parte quitinosa ligando postesternito e interesternito; CH Alavanca quitinosa; CX Coxa; DF Área odorífera; DH Hipoderme glandular; dHG Articulação coxo-dorsal; DI diafragma; DS Escama odorífera; DZ Célula glandular; E_1, E_2 Primeiro e segundo abaixamentos do esternito; EN Endocutícula; ES Epiesternito; EX Exocutícula; FE Fêmur; h Parte traseira; HS Parte traseira; HYP Hipoderme; IB Cálice de inserção; IN Inserção; IS Lado interno; IST Interesternito; LH Líquido da cavidade do corpo; LMU Músculo longitudinal; LO Dilatação em forma de colher; M Membrana; MF Membrana grande; MST Parte medial do esternito; MU_1 *Musculus abductor trochanteri;* MU_2 *Musculus adductor trochanteri;* N Nervo do tarso; NB Nervo da coxa; OE Entrada da grande dobra da mambrana; OL Lamela superior da escama; OST Postesternito; PST Preesternito, Jugulare; RI Estrias; SD Bordo lateral; SH Tendão; SR Reservatório; SS Escama irradiadora; TA1-5 Primeiro a quinto artículos do tarso; TG Tergito; TH Tórax; TI Tíbia; TL Trabécula; TO Trocanter; TR Traquéia; TS Trocantino; UL Lamela inferior da escama; V Parte da frente; VA Epimeron; VL Lista em forma de V; VP Pincel-distribuidor; VR Bordo anterior; VS Escama-distribuidora; SA Dentes da estria.

UEBERSETZUNG

Das Duftorgan des Maennchens von Mocis repanda Fabr., 1794 (Lepidoptera, Noctuidae, Sarrothripinae)

(Mit 25 Figuren)

1. Einleitung.
2. Skelett des Prothorax.
3. Duftfeld der Vordercoxen.
4. Funktion des Verteilerpinsels
5. Hintertibien und Hintertarsen.
6. Duftschuppen und Strahlhaare.
7. Zusammenfassung, Summary.
8. Literatur.
9. Abkuerzungen in den Abbildungen.

1. EINLEITUNG

Die Raupe der Noctuide *Mocis repanda* ist ein in Brasilien bekannter Schaedling, der an Gramineen, besonders an Mais, erheblichen Schaden anrichten kann. Der volkstuemliche Name ist *"lagarta dos milharais"*. Beim maennlichen Falter findet sich ein auffallendes Duftorgan, das bisher in der Literatur noch nicht beschrieben ist.

Bewegt man mit einer Pinzette vorsichtig ein Vorderbein des Maennchens nach vorne und etwas nach aussen, so breitet sich seitlich und nach vorne gerichtet ein grosser Haarpinsel aus, der auf einem seitlichen Anhang des Prothorax stehend zwischen Patagium, Tegula und Fluegelwurzel aus dem Schuppenkleid hervorkommt. Beide Pinsel zur gleichen Zeit ausgebreitet bieten einen ueberaus merkwuerdigen Anblick, der das Objekt zu einem der schoensten und zugleich seltsamsten unter den Lepidopteren macht. Das Studium dieses als Duftapparat zu bezeichnenden Organs ergab in Bezug auf den druesigen Teil nur wenig Neues fuer unsere Kenntnis von den Dufteinrichtungen der Schmetterlinge, dagegen zeigten sich bei Betrachtung das Pinsels so viele interessante Einzelheiten, dass der Druesenapparat eine naehere Darstellung verdient, dieses insbesondere, da das Organ im Gegensatz steht zu den von ELTRINGHAM (1937) beschriebenen Haarpinseln indischer Noctuiden, die z. T. als Duftstrahler (z. B. *Crocidolomia binotalis, Remigia frugalis*) bezeichnet werden, d. h. dass die Strahlhaare das Sekret ihrer eigenen Bildungszellen ausleiten und verdunsten lassen. Ausserdem ist der Mechanismus des Ausbreitens des Pinsels hier rein

physikalischer Natur, d. h. dass die Haare nicht durch Muskeln aufgerichtet werden, wie es ELTRINGHAM (1937) u. a. fuer *Crocidolomia binotalis*, BARTH (1951) fuer *Eriopyga lamptera* und ILLIG (1902) fuer *Syrichthus malvae* beschreiben. Das Aufrichten der Haare erfolgt automatisch durch die oben erwaehnte Vorwaertsbewegung der Coxen. Um den komplizierten Mechanismus zu verstehen, ist eine kurze Beschreibung des Prothoraxskeletts notwendig, die im folgenden Abschnitt gegeben wird.

Im Gegensatz zu diesen Verteilerpinseln findet sich auf dem hinteren Rand der Hintertibien und Hintertarsen ein Besatz von typischen Duftschuppen, an deren Basis sich Druesenzellen befinden, deren Sekret durch die Duftschuppen ausgeleitet und zur Verdunstung gebracht wird. Diese Einrichtung ist sinngemaess als Strahlapparat zu bezeichnen, waehrend die oben erwaehnten Schuppenpinsel Verteilerpinsel darstellen, die ein Sekret anderen Orts entnehmen und verdunsten lassen; ihre eigenen Bildungszellen dagegen sind degeneriert und haben in keinem Fall druesige Funktion.

2. SKELETT DES PROTHORAX

Der Prothorax von *Mocis repanda* ist in der fuer Lepidopteren typischen Weise modifiziert: Vom Notum des Tergits (Fig. 1, TG) ist nur noch eine schmale Platte erhalten, die durch grosse Membranen nach hinten mit dem Mesothorax verbunden ist. Nach vorne schliesst sich ein bogenfoermiges Stueck an, das wegen seiner Lage und als Insertionsflaeche der dorsalen Laengsmuskeln als Acrotergit (AT) mit dem Phragma der Fluegelsegmente zu homologisierem ist. In der Pleuralgegend findet sich das Episternum (ES) stark entwickelt, es setzt mit breiter Naht am Acrotergit an. Ventralwaerts schliesst sich ein kleiner Skeletteil an, an dessen Ende sich die vordere (sekundaere) Insertion der Coxa befindet. Damit ist dieser Teil als Trochantinus (TS) identifiziert. Im unteren Teil des Innenrandes des Episternums schliesst sich mit einer ebenfalls breiten Naht das sehr stark modifizierte Sternum (MST) an. Die Modifikation beruht auf dem als Kryptosternie bezeichneten Vorgang der Einfaltung und Versenkung grosser Teile des Sternums in die Brusthoehle. Hier ist jedoch die Kryptosternie noch nicht so hoch entwickelt wie bei der Gruppe der *Rhopalocera* und nicht soweit durchgefuehrt wie im eigenen Meso-und Metathorax, da in der vorderen Haelfte ein breiter Skeletteil erhalten ist. Dieser relativ grosse Teil des Sternits (Mesosternit, MST) entsendet nach vorne einen schmalen Fortsatz, der sich zu zwei T-foermigen Chitinspangen erweitert (PST), die mit ihren Armen das Hinterhauptsloch umgreifen und mit diesem einerseits, mit dem Arcosternit, Episternum und Mesosternum andererseits durch grosse Membranflaechen verbunden sind. Dieser Fortsatz entspricht dem Jugulare Berleses und ist als Prosternit zu bezeichnen. Der hintere Teil des Sternits ist zum groessten Teil in die Tiefe verlagert, so dass nur noch zwei kleine Teile (Post-und Intersternit, OST, IST in Fig. 2) erhalten sind, die als Raender zweier tiefer Einsenkungen (E1 und E2) mit schmalen Chitinbruecken einerseits zwischen sich, andererseits zum Mesosternit und mit einer V-foermigen Leiste (VL) zum Prosternit des Mesotharax die ventrale Laengsachse des Prothorax darstellen. An den Spitzen der Einsenkungen in der Brusthoehle inserieren einige ventrale

Laengsmuskeln (LMU). Der Hauptteil der Aussenflaeche des Prothorax ist membranoes.

Eine weitere Modifikation hat das Epimeron (VA in Fig. 1) der Pleuralgegend erfahren. Es ist im Ganzen vom Episternum losgeloest, bleibt mit diesem nur durch eine sehr grosse Membran verbunden und hat dorsal keine Verbindung zum Tergit. Es stellt einen in die Pleuralmembran eingelagerten freien Arm dar, der an seinem ventralen Ende das urspruenglich dorsale Hueftgelenk traegt (dHG in Fig. 3). Sein apikales Ende bildet eine loeffelartige Erweiterung (LO), in deren, in der Ruhelage nach hinten gewendeten Hoehlung die Borsten des Verteilerpinsels inserieren (siehe unten VP). Der Arm (VA) selbst besteht aus einem verstaerkten Vorderrand (VR in Fig. 4) und einer blattartigen Erweiterung (BE). Etwas unterhalb der Mitte setzt mit einem bogigen Stueck ein duenner Chitinhebel (CH) an, der nach flachen bogigem Verlauf durch die Pleuralmembran die Chitinbruecke (CB in Fig. 3) zwischen Post- und Intersternit erreicht und hier mit seinem hakenfoermigen Ende inseriert. Die grosse Membran in der Umgebung des Verteilerarms und des Chitinhebels bildet eine grosse Falte (MF), die den Arm und den Hebel mit dem Verteilerpinsel in der Ruhelage einhuellt. Nur ein schmaler Streifen des Verteilerpinsels ist am entschuppten Praeparat am Eingang der grossen Hautfalte zu sehen. Durch die starke Bedeckung mit Schuppen ist der ganze Apparat in der Ruhelage vollstaendig verborgen.

3. DUFTFELD DER VORDERCOXEN

Der druesige Teil des Duftapparats liegt auf der Hinterseite der im Querschnitt annaehernd dreieckigen Coxa (Fig. 3 u. 5). Bis auf schmale Raender ist die ganze Flaeche der Hinterseite mit Duftschuppen besetzt (Insertionsplan s. Fig. 6), die eng der Cuticula anliegen und durch lange Schuppen-und Haarsaeume auf den Raendern eingeschlossen werden. Auf 1 mm^2 entfallen etwa 1.325 Insertionen. Die Duftschuppen haben einen silbrigen Glanz und heben sich deutlich von den uebrigen Schuppen der Koerperbedeckung ab. In der Ruhelage legen sich die Coxen soweit nach hinten, dass die Hinterflaechen auf der Endmembran des Prothorax mit der V-foermigen Chitinleiste und auf dem Sternalteil des Mesothorax ruhen. Diese Stellen sind nackt und tragen besonders an den Raendern, aber auch laengs der Naehte grossflaechige, eng anliegende Schuppen. Bei Beruehrung kleben auch noch bei aelterem Trockenmaterial die Duftschuppen und die letztgenannten Schuppen am Instrument fest. Wegen dieser klebrigen Substanz lassen sich beide Schuppenarten nur schwer isolieren. An lebenden oder frisch getoeteten Faltern laesst sich ein feuchter Glanz sowohl auf beiden Schuppen wie auch auf der nackten Cuticula des Mesothorax feststellen, wenn der Verteilerpinsel vorher entfernt war. Letzterer liegt in der Ruhelage zwischen Coxa und Thoraxkoerper in der Weise eingeschlossen, dass er von aussen kommend sich mit seinem Ende auf die nackte Cuticulaflaeche auflegt und von dem langen Haarbesatz des Aussenrandes der Coxa eingeschlossen wird.

Auf dem Querschnitt (Fig. 5 u. 7) erweist sich die ganze Hypodermis der Hinterseite (HS) bis auf schmale Seitenraender (SR) druesig. Ausser

den beiden Trochantermuskeln, von denen der *musculus adductor* (MU_1) eine starke Sehne besitzt, waehrend der *musculus abductor* (MU_2) erst kurz vor der Insertion eine kurze Sehne ausbildet, und ausser dem Beinnerv (NB) finden sich in der Coxa zwei Blutraeume.

Der Hohlraum der Coxa wird durch ein deutlich sichtbares Diaphragma (DI) in zwei etwa gleiche Raeume geteilt. Das Diaphragma inseriert nahe der Aussen-und Innenkante der Coxa. Im hinteren Teil des Querschnitts findet sich der *musculus abductor trochanteri* (MU_2) und der Beinnerv, in dem vorderen der antagonistische Muskel und zahlreiche, stark erweiterte Tracheen (TR), die fast den ganzen Raum ausfuellen und nur um den Muskel herum etwas Platz fuer die Leibeshoehlenfluessigkeit freilassen. Der hintere Teil ist dagegen ganz mit dieser Fluessigkeit ausgefuellt. Die Cuticula der Hinterseite traegt die Insertionen der Duftschuppen. Die Fig. 7 zeigt staerker vergroessert einen Ausschnitt aus der Druesenflaeche. Die Druesenzelle ist flach-kubisch und fuellt mit ihrem Plasma einen Teil des Insertionskanals der Schuppe aus. Der Kern der Zelle stellt ein regelmaessiges Elipsoid dar und besitzt ein aufgelockertes Chromatin. Das Plasma ist je nach Sekretionsphase mehr oder weniger stark mit sehr kleinen Vakuolen angefuellt. Ein Ausleitungsapparat fehlt. Um die Oeffnung des Schuppenstiels bildet sich ein kleiner Hohlraum im Plasma (SR in Fig. 7), der als Sekretsammelraum bezeichnet werden kann. Die Insertion der Schuppe ist einfach und entspricht dem in Fig. 8 dargestellten Schema. Die Insertionsmembran ist lang und laeuft bis zum Ende des Schuppenstiels (nur durch Polarisation nachweisbar). Ausser den Druesenzellen finden sich einzelne sehr kleine Kerne in diesem Teil der Hypodermis, sie sind wahrscheinlich mit den Kernen der tormogenen Zellen zu homologisieren. Trotz der langen Insertionsmembran kann die Schuppe nicht aus ihrer Insertion heraustreten, da die Anschwellung ihres Stiels eine Bewegung nach aussen nicht zulaesst.

4. FUNKTION DES VERTEILERPINSELS

Waehrend der druesige Teil des Duftapparates recht einfach gebaut ist, stoesst man bei der Analyse der Funktion des Verteilerpinsels auf betraechtliche Schwierigkeiten in Bezug auf den Mechanismus der Ausbreitung. In der Fig. 9 sind die beiden Endphasen der Oeffnungsbewegung schematisch wiedergegeben, davon entspricht Fig. 9b der Fig. 3. In Fig 9a ist die Ruhelage dargestellt, doch ist die Coxa ein wenig angehoben, um den durch letztere in dieser Stellung verborgenen Chitinhebel (CH) zu zeigen. Dieser Hebel inseriert beweglich an der schmalen Chitinbruecke zwischen Post- und Intersternit des Prothorax. Am anderen Ende inseriert er am Arm (= Epimeron) des Verteilerpinsels in der Weise, dass er ueber dessen blattartige Erweiterung hinuebergreift und am verstaerkten Vorderrand des Armes ansetzt, entsprechend der Fig. 4b. Die Artikulation zwischen Coxa und Arm (= primaeres dorsales Hueftgelenk, dHG) liegt am hinteren Rand des Armes, wohin der verstaerkte Vorderrand umbiegt. Letzterer erweitert sich loeffelartig am apikalen Ende und nimmt die Pinselborsten in seiner jetzt konkaven Innenseite auf. Die Borsten (s. u.) inserieren sehr dicht, auf 1 mm^2 entfallen durchschnittlich 6.200

Insertionen. Sie stehen so dicht, dass die Wand der einen Insertion die der benachbarten beruehrt (Fig. 10 und 11a).

Bei der eingangs erwaehnten Bewegung der Coxa nach vorne und etwas nach aussen (s. Pfeil in Fig. 9a) wird das dorsale Hueftgelenk in einem kurzen Kreisbogen ebenfalls nach vorne transportiert, da das sekundaere (ehemals ventrale, jetzt vorne an der Coxa gelegene) Hueftgelenk durch das unbewegliche Episternum-Trochantinus-Stueck in seiner Lage verharrt. Da der Arm jedoch durch den Chitinhebel in seiner Mitte gehalten wird, muss diese Gelenkstelle als Drehpunkt dienen. Es kommt jedoch nicht zu einer einfachen Hebelbewegung, da der Drehpunkt und das ventrale Coxagelenk nicht in der Laengsachse des Armes liegen, sondern ersterer oberhalb, letzteres unterhalb der Achse. Die Folge ist eine spiralig um die Laengsachse gerichtete Drehbewegung verbunden mit gleichzeitiger Rueckwaertsbewegung des Kopfes des Verteilerarmes. Hierdurch wird der Pinsel aus der Membranfalte (MF) herausgehoben und der loeffelartige Endteil wird um etwa 180° gedreht, so dass seine Hoehlung mit dem Borstenbuendel jetzt nach vorne weist. Diese Bewegung verlaeuft aber nicht ungehindert. Die den Ruecken des "Loeffels" umhuellende Membran (Fig. 12a-d), die in der Ruhelage nur wenige kleine Falten zeigt, wird auf der der Bewegung voraneilenden Seite der Erweiterung angespannt. Diese Spannung zerrt die bezeichnete Seite waehrend der Bewegung nach hinten, waehrend der verstaerkte Vorderrand des Armes soviel Kraft besitzt, dass er den Gewoelbedruck der Hoehlung ueberwindet und letztere in ihr Gegenteil verwandelt. Die in der Hoehlung entstehende Spannung wird durch die tiefen Falten zwischen den Borsteninsertionen aufgehoben (Fig. 11). Die Folge ist das Aufrichten der Borsten auf dem Boden der ehemaligen konkaven, jetzt konvexen Seite des Traegers des Verteilerpinsels.

Das Schliessen des Pinsels erfolgt in einem sinngemaess rueckwaertsgerichteten Ablauf der oben erwaehnten Bewegungen.

5. HINTERTIBIEN UND HINTERTARSEN

Waehrend die thoracale Druese ein Komplexorgan darstellt, bei dem Druesenfeld und Verteilerpinsel weit von einander entfernt sind, erweist sich der Duftapparat der Hinterbeine als einfaches Organ, bei dem die Duftschuppen das Sekret ihrer eigenen Druesenzellen ausleiten und verdunsten lassen. ELTRINGHAM (1937) erwaehnt bei *Remigia frugalis*: "... and the hind-legs are of rather unusual form, being evenly fringed with scales throughout their entire length, reminding one of the swimming legs of some aquatic insects." Leider geht er nicht naeher auf den Bau der Hinterbeine ein, so dass ein Vergleich mit *Mocis repanda* nicht moeglich ist.

Mocis repanda zeigt die naemliche Bildung am Hinterbein (Fig. 15): Die hintere Kante des unteren Teils der Tibie, etwa in der Hoehe des oberen Spornpaares beginnend, und aller fuenf Tarsenglieder traegt einen fransenartigen Besatz von langen, an der Spitze loeffelfoermigen Schuppen (naeheres s. unten), so dass das Bein dem Schwimmbein eines Wasserinsekts wirklich aehnelt. Im Vergleich mit dem Tarsus des Weibchens ist der Durchmesser der Tarsenglieder beim Maennchen etwas groesser, im Verhaeltnis von etwa 1 : 1,8.

Im Querschnitt findet man in den Tarsengliedern eine stark erweiterte Trachee, die fast den ganzen Raum ausfuellt (Fig. 14 a). Im vorderen Teil wird durch ein wohlentwickeltes Diaphragma ein Blutraum abgegrenzt, der den Nerv und die Sehne der sehr kleinen *musculi abductores tarsi*, die sich in der Tibie finden, enthaelt. Im hinteren Teil des Querschnitts laesst die Trachee einen Raum fuer Leibeshoehlenfluessigkeit frei (punktiert in Fig. 14 a). Hier findet sich eine druesige Hypodermis, deren Zellen zu den oben erwaehnten Duftschuppen gehoeren. Sie sind zwar kleiner als die des Druesenfeldes in der Coxa, haben aber den gleichen Bau und reichen mit einem Auslaeufer in den Insertionskanal der Duftschuppen hinein. Die Insertion ist einfach und besitzt einen zylindrischen oder nur schwach erweiterten Kanal (Fig. 14b). Im Gegensatz zu den Insertionen auf der Coxa sind die Raender der Insertionsbecher kraeftig entwickelt. Der Anfang des Schuppenstiels ist in einfacher Weise an der Wand des Kanals befestigt. Da diese Stelle relativ tief liegt, resultiert eine starre Insertion der Schuppen, die in ihrer Gesamtheit das Bild einer Buerste hervorrufen.

6. DUFTSCHUPPEN UND STRAHLHAARE

Duftschuppen der Coxa

Die Form der Duftschuppen der Coxa (Fig. 15 a — d) ist sehr wechselnd. Im allgemeinen haben sie parallele Raender, doch schwankt das Verhaeltnis von Laenge zu Breite betraechtlich. Es gibt lange, schmale Formen in der Mitte der Duftfeldes (Fig. 15 d) und kurze, breite im basalen Teil des Traegers (Fig. 15 c). Von diesen mehr oder weniger symmetrischen Schuppen weichen die der Raender des Feldes durch ihre Asymmetrie ab (Fig. 15 a und b). Im Aufblick zeigen sich immer mehrere Laengsfalten und zahlreiche Laengsrippen, die niedrig sind und keine Querverbindungen besitzen. Auf 100 micra Breite entfallen im Durchschnitt etwa 130 Rippen. Die Masse der Schuppen liegen zwischen 230 : 20 micra und 150 : 50 micra. Die Schuppen zeigen einen bemerkenswerten Feinbau. Im Querschnitt (Fig. 16) erweisen sich die Waende sehr dick, Trabekel lassen sich nicht erkennen. Im unteren Teil besteht der Hohlraum nur aus einem Kanal (die folgenden Ziffern in Klammern beziehen sich auf Fig. 16) von wechselnder Breite (1, 2, 3). Nachdem die Schuppe ihre endgueltige Breite erreicht hat, teilt sich der Kanal in zwei (4, 5, 6, 7) oder (9) in drei Aeste auf. Zur Spitze hin naehern sich die Hohlraeume mehr und mehr der Oberflaeche (10, 11). Die Struktur des Chitins der Schuppe stellt ein sehr feinmaschiges, schwammiges Geflecht aus unregelmaessig verlaufenden Chitinfaeden oder-lamellen dar, von denen anzunehmen ist, dass es sich um grosse Micellen oder Konglomerate von Micellen handelt. Eine Oeffnung besitzen die Duftschuppen nicht. Es ist zu vermuten, dass das Sekret durch das schwammige Chitin und die Schuppenoberlamelle tritt, die es auf dem Wege der Diffusion durchdringt. Hernach breitet es sich auf der Schuppe aus und wird vom Verteilerpinsel, der in der Ruhelage auf dem Duftfeld liegt, aufgesogen.

Duftschuppen des Hinterbeins

Die Duftschuppen stehen sehr dicht, auf der Hinterkante der Tibie und des Tarsus eine rueckwaarts gerichtete Buerste bildend. Ihre Form stellt einen langgestielten Loeffel dar. Die Laenge des etwa 15 micra breiten Stiels betraegt 1,7 mm bei den groessten Formen, etwa 0,3 mm bei den kleinsten Formen, dagegen bleiben die Masse des Loeffels bei allen Formen etwa gleich und betragen 250 micra fuer die Laenge und 100 micra fuer die Breite. Es finden sich vereinzelt auch schmale Formen, wo der Loeffel bei 250 micra Laenge nur 45 micra breit ist. Die Gesamtlaenge der Duftschuppe schwankt demnach betraechtlich zwischen 1,95 und 0,55 mm.

Bemerkenswert ist der feinere Bau der Schuppe. In den Querschnitten der Fig. 14d, 14c, 17 und 18 erkennt man die beiden sehr duennen Lamellen (OL und UL), die durch zahlreiche Trabekel und Trabekelbuendel in ihrem Abstand, der ueberaus gering ist, gehalten werden. In unregelmaessigem Abstand erscheinen die Querschnitte der Rippen. Im Aufblick (Fig. 14 c und Fig. 19) laufen die Rippen auf der loeffelfoermigen Flaeche in weit geschwungenen unregelmaessigen Linien mit wechselndem Abstand ueber beide Lamellen der Schuppe, jedoch ohne dass sich benachbarte Rippen beruehren. Zur Spitze (Fig. 19) naehern sie sich, ohne jedoch miteinander zu verschmelzen. Der Grat der Rippen ist mit kleinen, zur Spitze gerichteten Schueppchen, die sehr regelmaessig stehen (Fig. 19 an den Raendern, Fig 14 c_1 chematisch) besetzt. Die Schueppchen mit etwa 0,86 micron Laenge, 0,26 micron Breite und 0,08 micron Dicke stehen entsprechend dem Schema in Fig 14 c_1 sich dachziegelartig ueberdeckend in einem Winkel von 25°-26° geneigt. Sie werden durch 5-6 Trabekel in einem Abstand von 0,08 micron von einander gehalten. Da sich ihre Spitze etwas nach unten neigt, verringert sich der Abstand an der Spitze eines Schueppchens von dem darunter liegenden auf 0,03 micron. Die Trabekel finden sich nur im basalen Teil auf 0,6 micron Laenge regelmaessig verteilt, waehrend die Spitzen freistehen und seitlich gesehen als Zaehne erscheinen. Offensichtlich sind bei der starken Aufloesung der Strukturen im Elektronenmikroskop bereits die groeberen Teile des micellaren Aufbaus erschlossen worden, die GENTIL (1951) von Schillerschuppen des Morphotyps darstellt und die in der Fig. 20 und 23 von denselben Schuppen (Aufnahme MUTH) wiedergegeben werden.

Zwischen den Rippen existieren keine Konektive im herkoemmlichen Sinne. Die die Rippen der Ober- und Unterlamelle verbindende Membran, die nirgends Durchbrueche zeigt (Fig. 21), ist nicht einheitlich gebaut. Im E. M. (Fig. 19 und 21) zeigen sich regelmaessige, ueberaus feine Querstrukturen auf der Membran beider Lamellen. Sie stellen Chitinleisten der Membran dar, die immer im gleichen Winkel von 45° von den Rippen nach hinten abzweigen, in der Mitte zwischen zwei Rippen um 90° nach vorne umbiegen, um wieder unter 45° von hinten die benachbarte Rippe zu erreichen. Da die Tiefenschaerfe des E. M. jedoch sehr bedeutend ist, erscheinen neben den Rippen beider Lamellen und den Querstrukturen der Oberlamelle auch die der Unterseite, so dass durch die sich ueberkreuzenden Strukturen das Rhombenmuster der Fig. 19 und 21 wie ein zierliches Filigran hervorgerufen wird. In der Fig. 21 liegen unten links zufaellig die Querstreifen beider Seiten uebereinander, so dass sie, hier parallellaufend,

dieses Muster nicht bilden koennen. Zwischen den Rippen, das Rhombenmuster verdeckend, finden sich die dunklen Silouetten der Trabekel. Die Breite der Strukturen dieses feinen Gitterwerks der Ober- und Unterlamelle ist sehr gering: auf 2,285 micra entfallen 20, d. h. auf 1 micron 8,7 Gitterstaebe und ebensoviele Zwischenraeume, die dieselbe Breite besitzen wie die Staebe, so dass sich fuer einen der Gitterstaebe ein Durchmesser von 0,057 micron ergibt. Diese Struktur ist mit der von BARTH (1950) diskutierten "Fensterstruktur" der Duftschuppen von *Papilio polysticus* zu identifizieren.

Vergleicht man die Anzahl der Gitterstaebe mit der der Trabekel, die die Schueppchen der Rippen fixieren, so erhaelt man auf 1 micron bezogen die gleiche Anzahl. In der Fig. 19 ist zu erkennen, dass beide Elemente miteinander koordiniert sind, so dass der Schluss berechtigt ist, dass die Gitterstaebe die seitliche Fortsetzung der Trabekel zwischen den Schueppchen darstellen.

Auf diese Weise ergibt sich eine Uebereinstimmung zwischen den Feinstrukturen der Rippen und der Membranen, d. h. dass beide Teile auf demselben micellaren System beruhen.

Schuppen des Verteilerpinsels

Diese Schuppen von 5,35-5,41 mm Laenge bestehen aus einem langen, schlanken und sehr duennen Stiel mit 10-12 micra Breite und einer bandfoermigen Spitze von 1,54-1,65 mm Laenge und 180-190 micra Breite. Im Spitzenband sind die beiden Lamellen sehr eng mit einander durch Trabekel verbunden, so dass der Hohlraum nur sehr gering ist (Fig. 18). Der Hohlraum des Stiels dagegen ist relativ gross mit langen Trabekeln, die bereits im Trockenpraeparat bei 500 facher Vergroesserung deutlich als Querstrukturen zu erkennen sind. Sie koennen in dieser Form Konektive vortaeuschen (Fig. 22).

Die Rippen laufen ebenfalls wie auf den Duftstrahlern der Hinterbeine in unregelmaessigen stark gebogenen Schlangenlinien ueber das Endband und weniger stark geschwungen ueber den ganzen Stiel.

Der feinere Bau der Schuppe zeigt auf dem Grat der Rippen ebenfalls den oben beschriebenen Aufbau aus kleinen Schuppen. Die Gitterstruktur der Membran ist dagegen nicht zu erkennen, da im Aufblick durch die starke Ausbildng der Trabekel nur diese in Erscheinung treten.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Duftorgane des Maennchens von *Mocis repanda* beschrieben. Es finden sich :

1. ein Duftdruesenfeld mit Duftschuppen auf der Vordercoxa mit einem Verteilerpinsel am stark modifizierten Epimeron. Der Pinsel wird bei der Vorwaertsbewegung der Coxa automatisch ausgebreitet.

2. ein Duftdruesenfeld an den Hinterraendern der Spitze der Hintertibie und aller fuenf Glieder des Hintertarsus.

Das erstgenannte Organ vertritt den Typ der Komplexorgane mit raeumlich entfernt inserierendem Verteilerpinsel. Das letztere ist ein einfaches Organ mit Strahlschuppen, die das Sekret ihrer eigenen Bildungszellen verdunsten lassen.

Es werden an Hand von Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop bisher unbekannte Feinstrukturen des micellaren Aufbaus der Strahlschuppen und der Verteilerschuppen beschrieben. Die lichtoptisch homogen erscheinenden Membranen der Strahlschuppen zeigen im E. M. sehr duenne Gitterstaebe, die eine Staerke von nur 0,057 micron besitzen. Die Rippen beider Schuppenarten setzen sich aus kleinen Schueppchen zusammen, die sich dachziegelartig ueberdecken, aber durch Stuetzbalken in geringem Abstand gehalten werden.

SUMMARY

In the present article the scent organ of *Mocis repanda* is descrived. There may be distinguished :

1. a field of scent glands with scent scales in the anterior coxa with a distributionbrush on the extremly modificated epimeron of the first thoracic segment. The brush is outstretched automaticly by moving the coxa foreward ;

2. a field of scent glands along the hind borders of the tip of the posterior tibia and of all five limbs of the hind tarsus.

The first mentioned organ represents a complex organ, the distribution-brush arrising at another part of the body. The second organ is a simples one with radiating scales which evaporate the excretion of their own cells (trichogenic cells).

In fig. 9 the two final states of the opening of the distribution-brush are represented. Fig. 9 a shows the position of the brush in the inactive state, only with the coxa being little heaved up to show the quitinous lever (CH) which otherwise is hidden by the coxa. The quitinous lever is movable and arrises at the strait quitinous ligation between the poststernit and the intersternit of the prothorax. On the other extremity it is fused to the stalk (= epimeron) of the distribution-bruh in the way that it passes across the foliated enlargement of the stalk and is fixed on the strengthened fore border of the same part, corresponding to fig. 4b. The articulation between the thorax and the stalk (= primitive, dorsal coxal articulation, dHG) is situated on the hind border of the stalk where the strengthened fore border turns to. The tip of the stalk is englarged to form a spoon and shelters the bristles of the tuft in its concave inner side. The bristles are densely attached; an overage of 6.200 attachments per mm^2 of them are counted. They are found to stand as crowded that the attachments touch each other (figs. 10 and 11).

Moving the coxa foreward and slightly to the side (confer arrow in fig. 9-a), the dorsal articulation of the coxa is also shifted forward in a short arc, because the secondary (formerly ventral, now right in the front of the coxa situated) coxal articulation is held in its position by means of the part formed by the episternum-trochantinus. As the stalk of the brush

is kept by the quitinous lever just in the middle part, this last point forms the centre of motion. Since the centre of motion and the ventral coxal articulation do not lie in the longitudinal axis of the stalk of the tuft, but the former above, the latter below the axis, the movement of the stalk is not a simple one. The consequence of this is a revolving motion in a spiral way, turning round the longitudinal axis and combined with a backward motion of the tip of the brush-stalk. By means of this movement the turf is lifted out of the membranous fold and the spoon-like tip of the stalk is turned by 180°. Now the cavity of the spoon with the still closed tuft in it is directed forward.

The motion, however, meets an impediment: The membrane, which covers the convex side of the spoon-like tip (figs. 12 a-d) and which in rest shows only a few small folds is bent on that side which during the motion remains in front of this part. The resulting tension draws the anterior side of the spoon during the motion backward, whilst the strengthened fore border of the stalk possesses sufficient power to overcome the pressure of the cavity of the spoon so that the latter is turned convex. The tension of this part is equilibrated by the deep folds between the sockets of the bristles of the now convex side of the support of the brush (fig. 11). In consequence the bristles are errect on the ground of the spoon-formed tip of the stalk.

The brush is clossed by the same motions running out contrary wise.

The finer features of the scent scale of the hind leg is very interresting. In the transversal section of figs. 14 d and e, 17 aud 18 there are shown the two very thin laminae (OL ond UL), which are kept apart by numerous columnae in always the same narrow distance. Viewed from above (figs. 14-c and 18), the streakes of the scales run over the spoon-like surface in form of irregular and oscillating lines with an alternating distance on both sides of the scale, but without two neighbouring streakes ever touch each other. On the tip of the scale (fig. 19) they approach themselves without melting into one. The ridge of the streakes is garnished with little scales which point to the tip of the scale. They are found always in the same distance (fig. 19 on the borders and fig. 14 c_1). The small scales (with 0,86 µ of length, 0,26 µ of width and 0,08 µ of thickness) corresponding to the scheme in fig 14 c_1 are arrising in an angle of 25°-30° covering each another like tiles. The distance between two scales is kept constant by 5-6 columnae and amounts to 0,08 µ. The points of the scales are slightly turned downward so that the distance between one scale to the following in the apical part is reduced to 0,03 µ. The columnae are found only in the basal 0,6 µ length of the scale and are regularly distributed, whilst the points of the scales are isolated and look like teeth if viewed from the side. The strong dissolution of the structures by the electronic microscope already reveals the rougher parts of the micellarian construction. These features where observed by Gentil (1951) in the brillant scales of Morpho, and are reproduced in figs. 20 and 23 of the same scales (photography by H. Muth).

Under the electronic microscope the membranes of both sides of the scales are observed to have regular, small and transverse borders branching off backward from the streakes by 45°. In the middle between two streakes they run foreward again by 90° to reach the neighbouring streak again under

45° (figs. 19 ond 21). The mentioned borders and their intervals are of the same width of 0,057 μ. On the ridge of the streak the borders bear the above metioned columnae of the small scales of the ridge.

8. LITERATUR

Siehe am Schluss des portugiesischen Teils.

9. ABKUERZUNGEN IN DEN ABBILDUNGEN

AT — Acrotergum; BE — blattartige Erweiterung; BM — Basalmembran; BO — Borste des Hinterrandes des Tarsus; CB — Chitinbruecke zwischen Post-und Intersternum; CH — Chritinhebel; CX — Coxa; DF — Duftfeld; DH — Druesenhypodermis; dHG — dorsales Hueftgelenk; DI — Diaphragma; DS — Duftschuppe; DZ — Druesenzelle; E1, E1 — erste, zweite Einsenkung des Sternums; EN — Endocuticula; ES — Episternum; EX — Exocuticula; FE — Femur; h — hinten; HS — Hinterseite; HYP — Hypodermis; IB — Insertionsbecher; IN — Insertion; IS — Innenseite; IST — Intersternum; LH — Leibeshoehlenfluessigkeit; LMU — Laengsmuskel; LO — loeffelfoermige Erweiterung; M — Membran; MF — grosse Membran; MST — Mittelsternum; MU1 — musculus abductor trochanteri; MU2 — musculus adductor trochanteri N — Nerv des Tarsus; NB — Nerv der Coxa; OE — Oeffung der grossen Membranfalte; OL — Oberlamelle der Schuppe; OST — Poststernum; PST — Praesternum, Jugulare; RI — Rippen; SD — Seitenrand; SH — Sehne; SR — Sekretsammelraum; SS — Strahlschuppen; TA 1-5 — erstes bis fuenftes Tarsenglied; TG — Tergit; TH — Thorax; TI — Tibia; TL — Trabekel; TO — Trochanter; TR — Trachee; TS — Trochantinus; UL — Unterlamelle der Schuppe; v — vorne; VA — Epimeron; — VL — V-foermige Leiste; VP — Verteilerpinsel; VR — Vorderrand; VS — Verteilerschuppe; SA — Zaehnchen der Rippen.

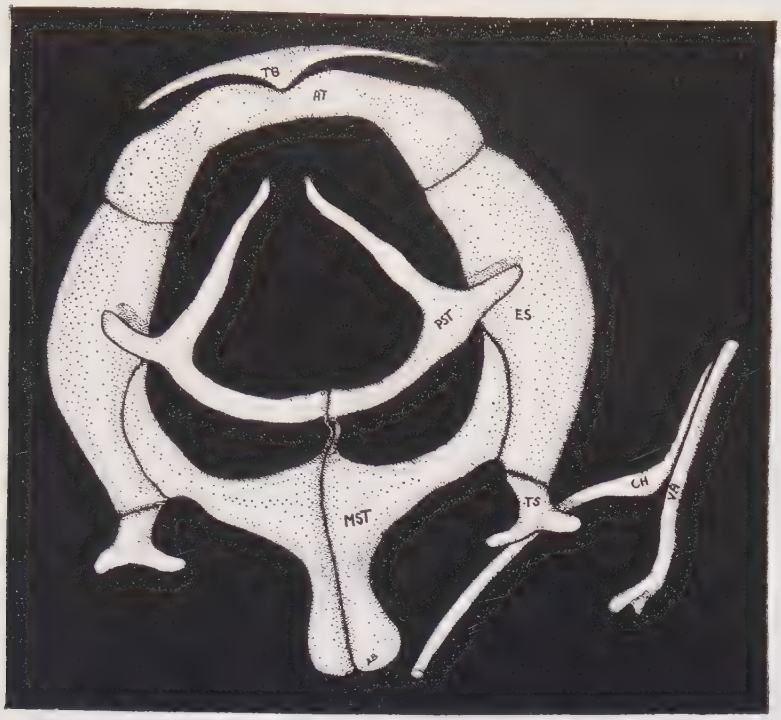


Fig. 1

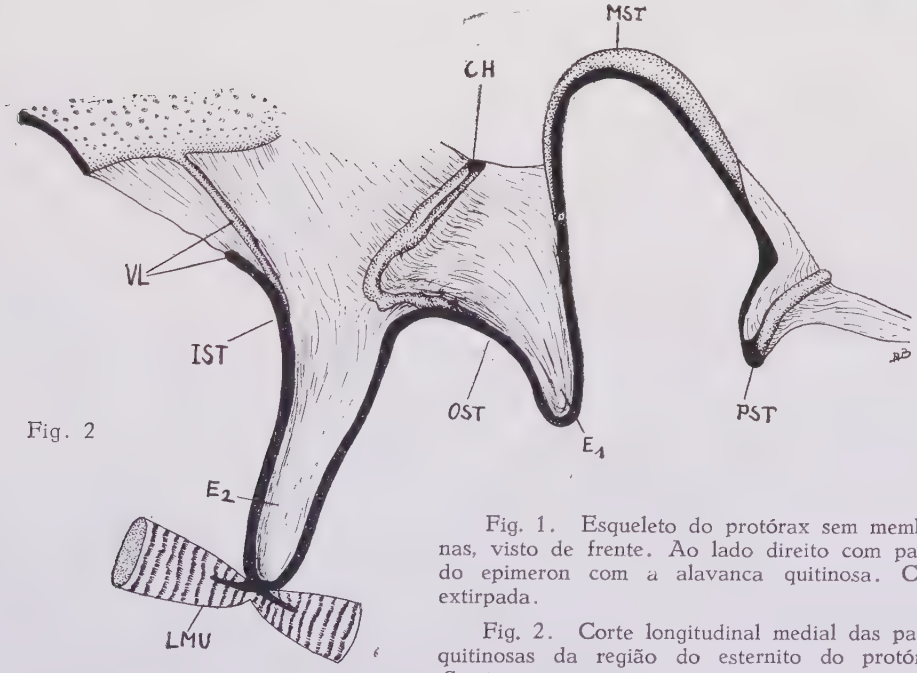


Fig. 2

Fig. 1. Esqueleto do protórax sem membranas, visto de frente. Ao lado direito com partes do epimeron com a alavanca quitinosa. Coxa extirpada.

Fig. 2. Corte longitudinal medial das partes quitinosas da região do esternito do protórax. Semi-esquemático.

Fig. 1. Skelett des Prothorax ohne Membranen, von vorne gesehen. Rechts Teile des Epimerons mit Chitinhebel. Coxa entfernt.

Fig. 2. Medianer Laengsschnitt, halbschematisch, durch die Chitinteile der Sternalregion des Prothorax.

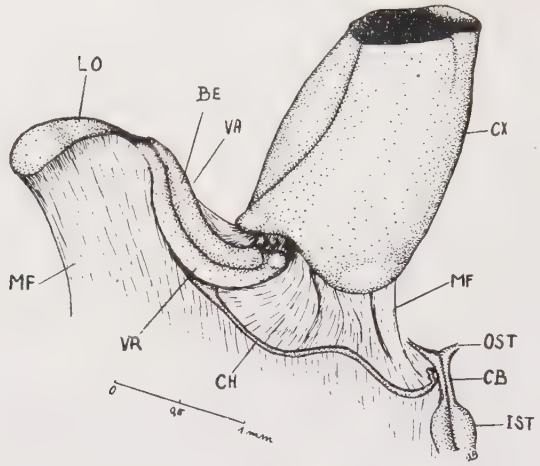


Fig. 3

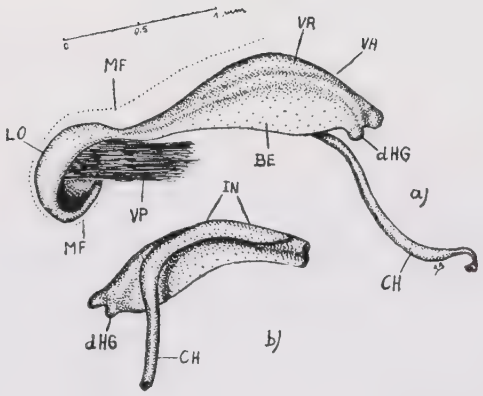


Fig. 4

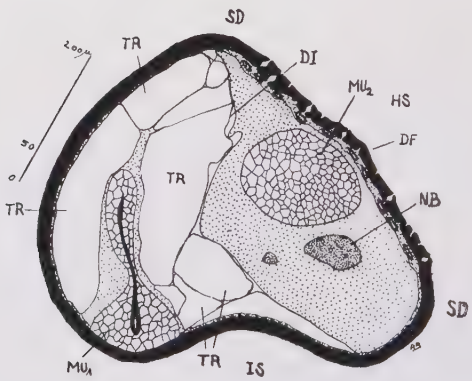


Fig. 5

Fig. 3. Lado direito do protórax visto de baixo. Coxa fortemente deslocada para frente.

Fig. 4. Epimeron (isolado) do lado direito do corpo. a) em repouso; b) parte basal vista de baixo com inserção da alavanca quitinosa.

Fig. 5. Corte transversal da coxa com área odorífera.

Fig. 3. Rechte Seite des Prothorax von unten. Coxa extrem nach vorne bewegt.

Fig. 4. Epimeron (isoliert) der rechten Koerperseite, *a*) in Ruhestellung, *b*) basaler Teil von unten gesehen mit Insertion des Chitinhebels.

Fig. 5. Querschnitt durch die Coxa mit Duftfeld.

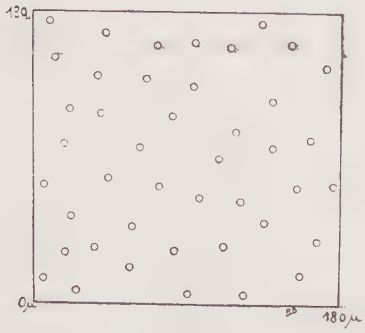


Fig. 6

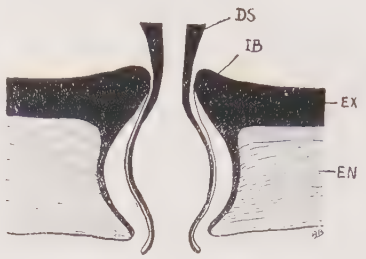


Fig. 8

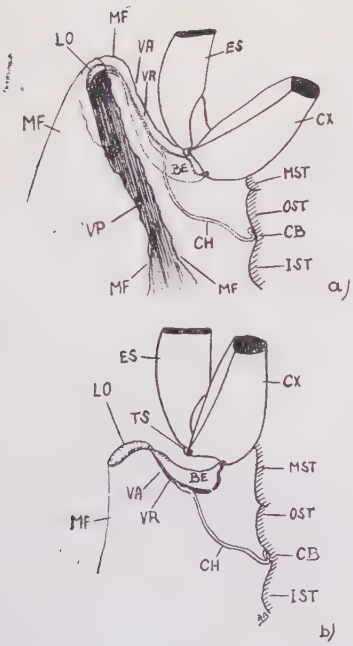


Fig. 9

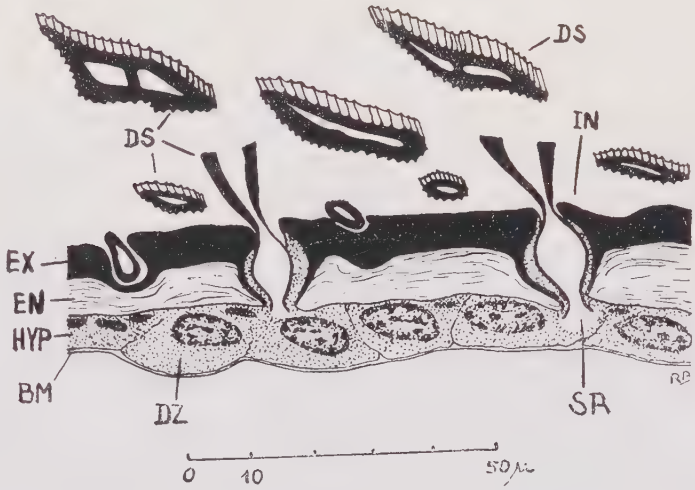


Fig. 7

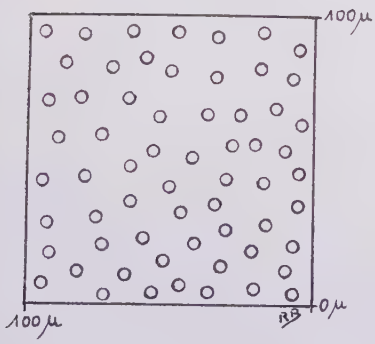


Fig. 10

Fig. 6. Esquema da inserção da área odorífera.
Fig. 7. Corte transversal da área odorífera da coxa.
Fig. 8. Esquema da inserção das escamas odoríferas da área odorífera da coxa.
Fig. 9. Esquema do mecanismo da abertura do pincel-distribuidor. a) posição em repouso, porém a coxa foi um pouco deslocada para cima a fim de se ver a alavanca quitinosa. b) coxa puxada para a frente, a expansão em forma de colher está aberta.
Fig. 10. Esquema de inserção das cerdas do pincel-distribuidor.

Fig. 6. Insertionsplan des Duftfeldes.
Fig. 7. Querschnitt durch das Duftfeld der Coxa.
Fig. 8. Schema der Insertion der Duftschuppen im Duftfeld der Coxa.
Fig. 9. Schematische Darstellung des Mechanismus zur Ausbreitung des Verteilerpinsels. a) Ruhelage, die Coxa ist jedoch etwas angehoben, um den Chitinhebel darzustellen. b) Coxa nach vorne bewegt, die loeffelartige Erweiterung des Epimeron ist ausgebreitet.
Fig. 10. Insertionsplan der Borsten des Verteilerpinsels.

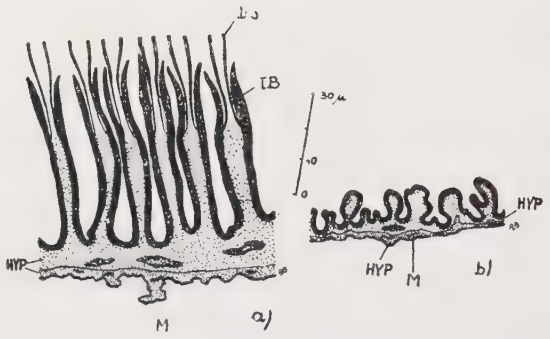


Fig. 11

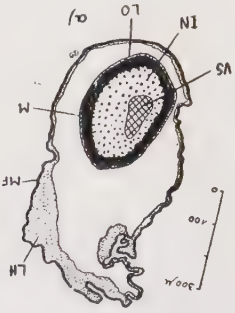


Fig. 12

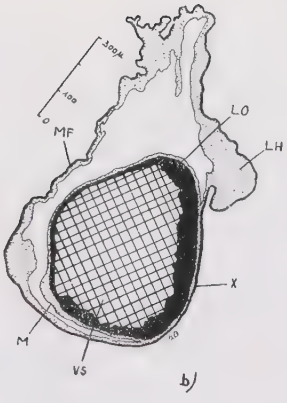


Fig. 12-A

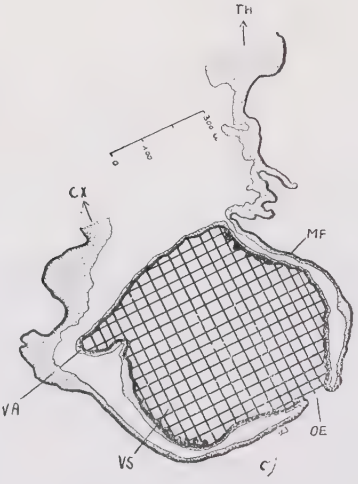


Fig. 12-B

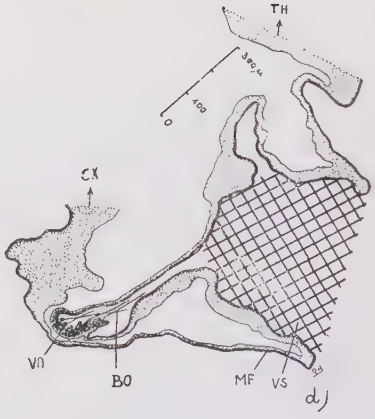


Fig. 12-C

Fig. 11. Corte transversal da cutícula da expansão em forma de colher do epimeron. a) com inserção de escamas-distribuidoras; b) cutícula do bordo.

Fig. 12. Quatro cortes transversais da expansão, em forma de colher, do epimeron. A grande membrana, no ponto X, é fundida com a expansão em forma de colher, c) em VA o começo de pedúnculo do epímeron dentro de uma dobra membranosa, d) o lado externo do pedúnculo do epímeron é tomado por cerdas finas.

Fig. 11. Querschnitt durch die Cuticula der loeffelartigen Erweiterung des Epimeron. a) mit Insertionen der Verteilerschuppen, b) Cuticula des Randes.

Fig. 12. Vier Querschnitte durch die loeffelartige Erweiterung des Epimeron (= Basis des Verteilerpinsels) in Ruheste lung. a) in der Tiefe der Hoehlung, b) die grosse Membran ist bei X mit der loeffelartigen Erweiterung verwachsen, c) bei VA beginnt der Stiel des Epimeron in einer Membranfalte, d) die Aussenseite des Stiels des Epimerons ist mit duennen Borsten besetzt.

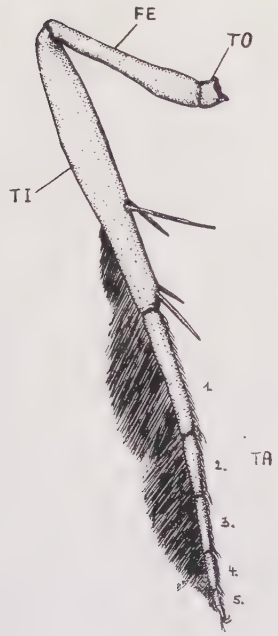


Fig. 13

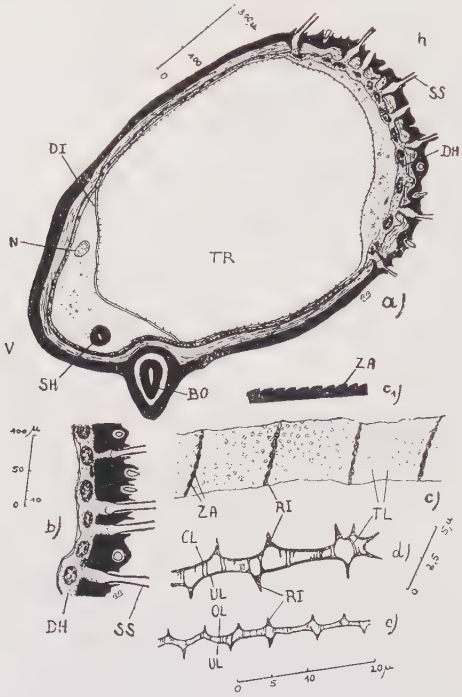


Fig. 14

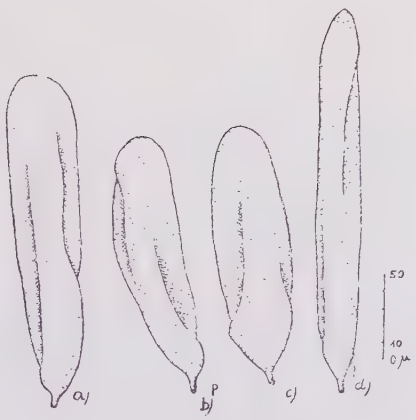


Fig. 15

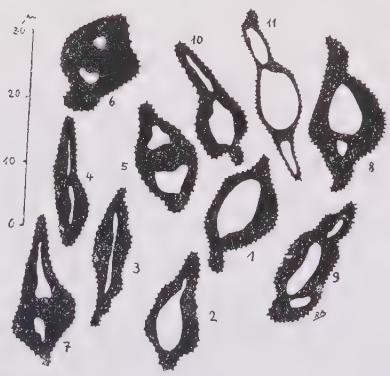


Fig. 16

Fig. 13. Perna posterior do lado esquerdo. Comprimento da tíbia e tarso é de 13mm.
Fig. 14. Perna posterior. a) corte transversal da metade do primeiro artículo do tarso, b) parte da hipoderme glandular, c) escama irradiadora vista de cima, c_1) estria vista de lado, d) e e) cortes transversais das escamas disseminadores.
Fig. 15. Escama odorífera da coxa.
Fig. 16. Cortes transversais das escamas odoríferas da coxa. (Explicação veja o texto).

Fig. 13. Linkes Hinterbein. Laenge von Tibia und Tarsus 13 mm.
Fig. 14. Hinterbein. a) Querschnitt durch die Mitte des ersten Tarsenglieds, b) Teil der Druesenhypodermis, c) Flaechenansicht der Strahlschuppe, c1) Rippe in Seitenansicht, d) und e) Querschnitte durch die Strahlschuppen.
Fig. 15. Duftschuppe der Coxa.
Fig. 16. Querschn tte durch Duftschuppen der Coxa. (Erklaerung siehe Text.).

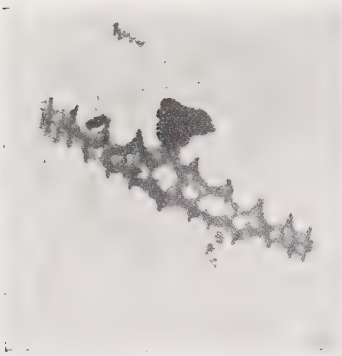


Fig. 17

Fig. 18

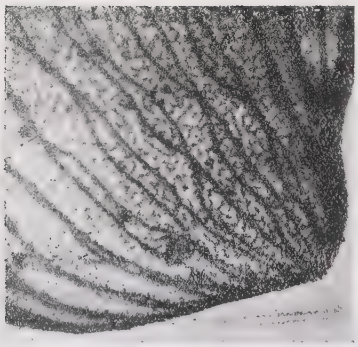


Fig. 19

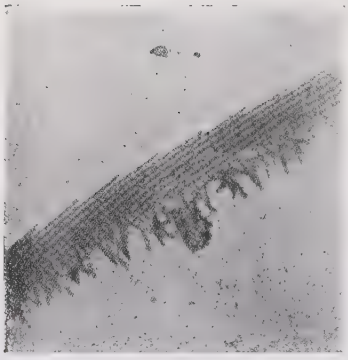


Fig. 20

Fig. 17. Corte transversal da escama odorífera da perna porterior. Foto com o microscópio eletrônico. Aumento 2.300 vêzes. O corte é um pouco inclinado deixando ver também partes da estrutura da membrana (N.° 695 da coleção MUTH).

Fig. 18. Como fig. 17, aumento 4.500 vêses (N.° 689 da coleção MUTH).

Fig. 19. Parte apical de uma escama odorífera da perna porterior. Aumento 2.300 vêzes. (N.° 152 da coleção MUTH).

Fig. 20. Corte longitudinal da estria da escama brilhante e transparente de *Morpho menelaus*. Aumento 2300 vêzes. A lamela inferior é destruida. Em baixo as trabéculas, em cima as lamelas com estruturas de apóio formando a estria. (N.° 977 da coleção MUTH).

Fig. 17. Querschnitt durch die Duftschuppe des Hinterbeins. E. M. Vergroesserung 2.300 fach. Der Schnitt liegt etwas schraeg, so dass auch Teile der Membranstruktur zu erkennen sind. (Negativ Nr. 695 der Sammlung MUTH).

Fig. 18. Wie Fig. 17, Vergroesserung 4.500 fach. (Negativ Nr. 689 der Sammlung MUTH).

Fig. 19. Aufblick auf den Spitzenteil einer Duftschuppe der Hinterbeines. E. M. Vergroesserung 2.300 fach. (Negativ Nr. 152 der Sammlung MUTH).

Fig. 20. Laengsschnitt durch eine Rippe der transparenten Schillerschuppe von *Morpho menelaus*. E. M. Vergroesserung 2.300 fach. Die Unterlamelle ist zerstoert. Unten die Trabekel, darueber die Lamellem mit Stuetzstrukturen, die die Rippen zusammensetzen. (Negativ. Nr. 977 der Sammlung MUTH).

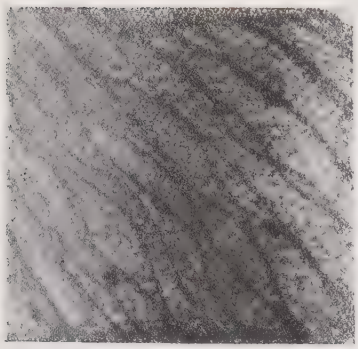


Fig. 21

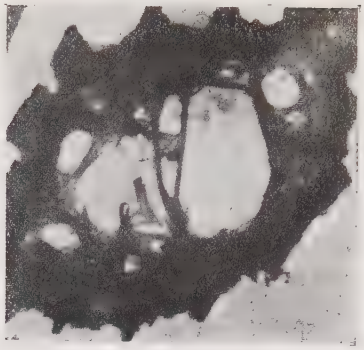


Fig. 22

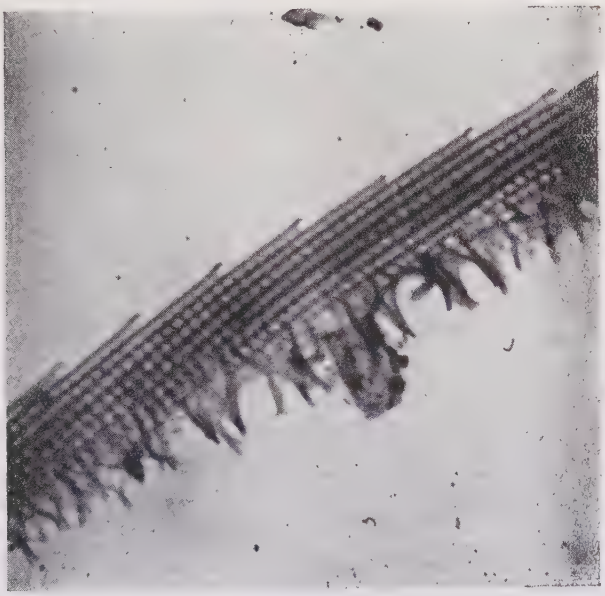


Fig. 23

Fig. 21. Vista de cima de uma escama odorifera da perna posterior com estrias e estruturas das lamelas superior e inferior. Aumento 3.500 vêzes. (N.° 154 da coleção MUTH).

Fig. 22. Corte transversal do pedúnculo da escama odorifera da perna posterior, direção do corte um pouco inclinado. Parede com trabéculas e estrutura esponjosa. Aumento 4.500 vêzes. (N.° 699 da coleção MUTH).

Fig. 23. Parte da figura 20 oticamente aumentada até 4.300 vêzes. E' de chamar atenção a continuação das trabéculas para a estrutura vertical da estria.

Fig. 21. Aufblick auf die Flaeche der Duftschuppe des Hinterbeines mit Rippen und Strukturen der Ober-und Unterlamelle, E. M. Vergrosserung 3.500 fach. (Negativ Nr. 154 der Sammlung MUTH).

Fig. 22. Querschnitt durch den Stiel der Duftschuppe des Hinterbeines mit schwach diagonaler Schnittrichtung. Trabekel und spongioeser Aufbau der Wandung. E. M. Vergroesserung 4.500 fach. (Negativ Nr. 699 der Sammlung MUTH).

Fig. 23. Teil der Figur 20 optisch auf 4.300 fache Vergroesserung gebracht. Es wird besonders auf die Fortsetzung der Trabekel in die senkrechten Gitterstrukturen der Rippe aufmerksam gemacht.

Fig. 24

Fig. 25

Fig. 24. Parte da figur 19 òticamente aumentada até 6.500 vêzes.
Fig. 25. Cabeça e protórax sem escamas, visto do lado. Coxa I puxada para a frente, ficando, assim, estendido o portador do pincel. Pincel retirado. Nas membranas claras nota-se a bifurcação formada por epímeron e alavanca quitinosa, acima o portador e a expansão em forma de colher. (Foto: LACERDA).

Fig. 24. Teil der Figur 19 optisch auf 6.500 fache Vergroesserung gebracht.
Fig. 25. Kopf und Vorderbrust entschuppt, von der Seite gesehen. Coxa I nach vorne gezogen, der Traeger des Pinsels dadurch ausgestreckt. Pinsel entfernt. Auf den hellen Membranen bemerkt man die aus Epimeron und Chitinhebel gebildete Gabel, darueber den Traeger mit der loeffelartigen Erweiterung.

Guerra Bacteriológica Contra os Hospedeiros Intermediários da Esquistossomose Humana (*)

por

Emmanuel Dias

No Posto do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí, Minas Gerais — criado em 1943, por ordem do Diretor Henrique Aragão, com o fim especial de investigar a doença de Chagas e sua profilaxia — foram iniciadas pesquisas sôbre esquistossomose, em agôsto de 1952. Os resultados de um inquérito preliminar foram comunicados em outubro do mesmo ano (1).

Foram experimentados alguns agentes físicos e químicos contra o *Australorbis glabratus*, mas tais experiências foram depressa interrompidas, sendo iniciadas pesquisas com agentes biológicos. Foram isoladas de caramujos algumas amostras de bactérias, que entretanto não mostraram nenhuma ação contra êsses moluscos.

Admitiu-se então que, se presentes nesses animais microorganismos atual ou potencialmente virulentos, eles poderiam ser mantidos por meio de passagens ininterruptas de caramújo a caramújo, e que talvês sua atividade pudesse ser aumentada através as passagens.

No dia 6 de setembro foram iniciadas três séries de passagens, cada uma com 5 caramújos vivos em 250 cc. dagua; enquanto que a duas delas foram juntadas culturas bacterianas indeterminadas, em uma foi adicionado apenas o triturado de 5 molúscos normais. A princípio, cada três dias os planorbídeos eram macerados em 250 cc. dagua com 5 caramújos vivos procedentes de focos naturais, mas depois as passagens passaram a ser feitas cada dois dias, da mesma maneira, não sendo as culturas adicionadas senão na primeira passagem. Posteriormente, muitas outras séries de passagens foram feitas, sendo notado que algumas eram mais ativas do que outras e que às vêzes são observados certos sinais típicos, indicadores da morte próxima dos caramújos. Do ovotéste de molúscos que apresentam tais sinais (retirado após semi-secção da carapaça, sendo o animal e o orgão banhados repetidas vêses em éter), foram isoladas bactérias, cortando-se a extremidade posterior do orgão, tocando-se a superficie de secção em placa de agar e espalhando-se.

(*) Comunicação ao V Congresso de Medicina Tropical e Malária, Istambul, 28 de agôsto a 4 de setembro de 1953, com 5 figuras adicionais.

Desde que os gérmes assim isolados eram aparentemente os primeiros a invadir os tecidos, podia-se supôr serem eles os responsáveis pela morte dos animais nas passagens em série. Tais gérmes foram cultivados em caldo simples e experimentados no campo contra caramújos, com resultados preliminares que foram considerados muito promissores (2).

A espécie mais frequentemente assim isolada é um *Bacillus* não patogênico, denominado convencionalmente BET (bacilo de espóro terminal), que foi estudado em cooperação com o Dr. Oswaldo Cruz Filho e que é aparentemente uma nova espécie. No momento, parece suficiente informar que se trata de um bacilo Gram variável, móvel, provido de espóro terminal (fig. 1); pleomórfico, aeróbio, mesófilo; proteolítico; indol positivo; não fermenta os hidratos de carbono comuns; acetilmetilcarbinol, negativo; tolerante ao sal; pH ótimo 7,0 a 7,2; não patogênico para vertebrados, mesmo a inoculações maciças.

Umas poucas séries continuam a ser mantidas no laboratório, a fim de se procurar aumentar a atividade do BET contra os molúscos.

As primeiras experiencias de campo foram feitas em pequenos poços, devido à falta de material para o preparo de grandes quantidades de cultura. Os resultados foram publicados em parte (2). Observações posteriores mostraram que em 6 poços artificiais em que moluscos vivos foram introduzidos foi obtida uma mortalidade de 100%, bem como em 6 outros poços semelhantes. Quanto aos três primeiros focos naturais tratados, os resultados observados até o momento são os seguintes:

Foco 1 — Volume, 1.466 litros dágua; tratado com 5 litros de cultura. Após 214 dias, mortalidade de 99,8% (total de mortos recolhidos 4.060 caramújos, ainda vivos 8). Recem-nascidos vivos foram vistos muitas vêses, mas morriam em poucos dias.

Foco 2 — Volume 680 litros, tratado com 3,5 l. de cultura: mortalidade de 100% em 59 dias (total de mortos 693). No 69.° dia após o único tratamento, novos caramújos foram introduzidos no tanque, tendo morrido todos no 174.° dia após o tratamento. O bacilo BET foi isolado da água e de caramújos vivos mais de 6 meses depois da aplicação da cultura.

Foco 3 — Volume 260 l., recebeu 7 l. de cultura: 100% de mortalidade no 140.° dia. O seguinte exemplo mostra que a adição de peptona em pó às culturas, no momento do uso, é bastante eficaz:

Foco 25 — Volume 1.020 l., tratamento com 15 l. de cultura com 1 libra de peptona: 100% de mortos em 12 dias (colonia natural em tanque artificial). Caramujos vivos foram introduzidos no 30.° dia, e no 106.° dia a mortalidade era de 95,1%.

Foi feita a adição de peptona não só porque ela melhora as condições nutritivas do meio, como tambem porque as proteinas provavelmente não são atacadas pelas bactérias na ausencia de traços de peptona. Parece provavel que a ação do BET sôbre os planorbídeos dependa da elaboração de enzimas proteolíticas.

Devido ao fato de que bactérias proteolíticas foram isoladas de caramújos vivos aparentemente normais, foi feita a seguinte experiencia:

Foco 45 — Volume 185 l. Tratado com 1 kg de peptona mais o macerado de 100 caramújos. Mortalidade total foi verificada no 8.° dia. Novos planorbídeos foram introduzidos no 12.° dia, morreram todos no 17.° dia. De novo introduzidos planorbídeos no 25.° dia, todos mortos no 28.° dia após o único tratamento.

Em dois pequenos focos naturais aos quais foi aplicada peptona pura em pó, todos os caramújos estavam mortos depois de 7 dias, quando foi feita a primeira observação dos resultados.

Tambem no laboratório a ação letal da peptona em relação aos planorbídeos é facilmente demonstrável, podendo a morte ocorrer em um, dois ou mais dias, conforme a concentração. Por outro lado, a ação do BET puro sôbre os caramújos é antes lenta, tardando mesmo até 4 semanas ou mais, sendo os mortos retirados — mas pelo aumento da concentração bacteriana pode obter-se uma mortalidade mais rápida.

Para se comparar o efeito de peptona pura e de peptona com BET contra o *A. glabratus*, foram feitas duas séries de diluições de peptona de 1:100 a 1:102.400 (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 etc.), em volume de 100cc. para cada diluição. Um cc. de cultura de BET foi acrescentado a cada uma das diluições de uma das séries e três caramújos vivos foram colocados em cada vidro de ambas as séries. Ao passo que na série de diluições de peptona com BET todos os molúscos morreram de 2 a 7 dias em todas as diluições, na série com sòmente peptona, dentro do mesmo prazo, eles morreram só até à diluição de 1:3.200. Nas diluições mais altas de peptona pura a mortalidade total foi observada de 11 a 30 dias. Os caramújos de ambas as séries eram retirados tão cêdo quanto possível após a morte.

As duas seguintes experiencias mostram que os planorbídeos podem ser mortos de modo muito simples, usando-se apenas agua e caramujos.

Foco 16 — Num foco natural em que foi observada elevada mortandade espontânea de caramújos, foram colhidos 81 vivos e deixados em 1 litro dágua da bica. Ao cabo de 3 dias, havendo morrido 36 caramújos, a água com planorbídeos vivos e mortos foi lançada num poço artificial que continha 200 caramújos em 81 litros dágua (2), morrendo todos os animais em 13 dias. Após sua remoção, 100 novos caramújos foram colocados e, na última verificação feita 52 dias depois, só dois molúscos vivos foram encontrados.

Foco 20 — Tal como na experiencia anterior, 90 caramújos foram colhidos num outro foco natural e deixados no laboratório, em 1 litro dágua. Em 6 dias morreram 73 deles. A agua com todos os molúscos foi então lançada noutro poço artificial, que continha 100 caramújos vivos num volume dágua de 53 litros. Ao fim de 45 dias não restava nenhum molúsco vivo e outros 100 foram introduzidos. No 185.º dia após o tratamento apenas se encontraram 3 planorbídeos vivos.

E' provavel que os resultados destes dois ensaios teriam sido mais rápidos se à agua contendo os caramujos, utilizada para o tratamento, houvesse sido adicionada de peptona e cultura do bacilo.

Experiências em larga escala

Para fins práticos, grandes quantidades de meio de cultura (agua de peptona a 1% ou caldo simples) podem ser convenientemente preparadas em tambores de 200 litros de capacidade. Não sendo necessária uma esterilização perfeita, é suficiente aquecer o meio à ebulição alguns minutos, ajustar a reação a 7.2 ou 7.4 e semear abundantemente com uma cultura pura de BET, depois de resfriamento a 50° ou 60°. A incubação a 37° é desnecessária. Boas culturas foram obtidas mesmo sem fervura do meio, sòmente com moderado aquecimento.

O tratamento de focos grandes pode ser feito mediante simples lançamento da cultura na água, parecendo ser melhor, para isto, o uso de bombas ou aspersores. Represas e grandes poços são melhormente tratados nas margens, no fundo e na vegetação flutuante, quando existe. As valas devem ser tratadas em toda sua extensão. O tratamento de cursos dágua deve ser feito intensivamente em diversos pontos, de preferência nos lugares onde a água é menos movimentada, que são precisamente aqueles que oferecem melhores condições para a pululação dos caramújos; dêsses lugares as bactérias vão sendo continuadamente levadas pela agua corrente. Quanto maiores as quantidades empregadas de cultura e de peptona, melhor será, pois não só poderá ser mais rápido o efeito do tratamento sôbre às colonias de molúscos, como também aparentemente será mais duradoura a proteção contra a reinfestação. Para tratamentos intensivos, poderão ser empregados 5 a 10 kg de peptona, ou mais, em cada 200 litros de cultura, adicionados no momento do uso. Para tratamento de rotina é dispensável o cálculo dos volumes dágua, desde que se procure obter uma bôa contaminação aparente do meio.

Passamos a dar alguns exemplos de focos grandes tratados, de acôrdo com os resultados disponiveis até o momento.

Foco 19 — No dia 8 de abril de 1953 foi feita a aplicação de 150 litros de cultura com 3 libras de peptona num poço (fig. 3) com cêrca de 160.000 litros dagua e numa nascente que o abastece, a pequena distância dele. De 1.º de fevereiro a 7 de abril foram recolhidas no local 4.146 carapaças de planorbídeos para limpesa do foco; de 16 de abril a 30 de julho (112 dias após o tratamento), 14.878 mortos foram apanhados, sendo que na última data apenas 108 vivos foram contados, o que dá uma mortalidade de 99,1%. Muitas vezes foi observada a existência de incontáveis caramujos recem-nascidos mortos, fato este que não ocorria antes do tratamento. Os peixes permaneceram vivos.

Foco 26 — Uma vala em parte canalizada (figs. 4 e 5), com mais de 50.000 litros dágua recebeu em 7 de abril 150 litros de cultura e cinco quilos de peptona. Na ocasião, grande quantidade de caramujos vivos e raras cacas li existiam. De 16 de abril a 8 de agôsto (134 dias) recolheram-se 4.311 planorbídeos mortos, sendo encontrados apenas 8 vivos a 8 de agôsto de 1953 (mortalidade de 99,8%).

Foco 27 — Trata-se de um grande poço, ou açude (fig. 6), de 60 m. de comprimento por 30 m. de largura, alimentado por três nascentes situadas no fundo e com três saidas dágua, cujo volume foi calculado em 2.181.000 litros, com vasão de cêrca de 600 litros por minuto pelas três saidas. Era este o mais intensamente infestado foco de Bambuí, vendo-se por toda parte numero colossal de caramújos (na maioria *A. glabratus*), sendo que as margens eram especialmente ricas em recem-nascidos. Durante vários dias antes do tratamento foi recolhido um total de 10.057 cascas antigas. Muito raros caramújos jovens foram encontrados mortos.

O tratamento foi feito no dia 19 de abril de 1953, sendo empregados 1943 litros de cultura e 15 quilos de peptona. As margens do açude, o fundo e a vegetação sobrenadante foram intensamente aspergidos. Os primeiros caramujos moribundos e mortos foram encontrados no 3.º dia, aumentando diáriamente seu número. Foi começada a coleta de mortos no 11.º dia; após a contagem, eram envolvidos em gaze e deixados na água do poço e, depois que se tornaram numerosos, ficaram num tambor (fig. 7) perfurado semi-imerso na água. Isto foi feito para se evitar o desperdício de bactérias dos corpos em decomposição. A estimativa do número de caramujos vivos do foco era impossivel no começo, e mais tarde ela foi considerada dispensável porquanto as observações seriam continuadas até o eventual desaparecimento de todos os molúscos. Caso o tratamento viesse a perder a eficácia, perceber-se-ia desde logo a re-população do foco, pois começariam a sobreviver e crescer os caramujos jovens, em vês de morrerem em poucos dias, como se verificava. Os resultados das contagens realizadas até agora são os seguintes.

FOCO 27

N.º de dias após o tratamento	N.º de caramujos mortos coletados	N.º total de mortos
11	942	942
12	1.305	2.247
13	1.558	3.805
14	1.820	5.625
15	2.607	8.232
25	5.406	13.638
41	8.916	22.554
48	7.213	29.767
55	6.914	36.681
62	9.097	45.778
69	11.616	57.394
76	10.901	68.295
83	13.853	82.148
90	7.862	90.010
97	10.563	100.573
104	10.526	111.099
111	13.753	124.852
118	14.771	139.623
125	15.879	155.502

Atualmente, dificilmente se vêem caramújos vivos no açude e os jovens que abundavam antes nas margens desapareceram completamente desde algumas semanas. Deve ressaltar-se que sòmente foram contados os mortos coletados; muitos outros devem ter morrido sem que fossem achados, especialmente jovens. Os peixes permaneceram vivos.

Um outro fato importante verificado é o de que os molúscos desapareceram dos pequenos cursos dágua que emanam do açude, embora eles não tenham sido diretamente tratados com cultura. Semelhante efeito à distância foi também observado em outros focos dágua corrente. Por muitas vêzes o bacilo BET foi isolado de caramújos vivos e mortos do foco, bem como de peixinhos vivos. Além do *A. glabratus,* a ação letal do BET foi também observada em relação a outras espécies de planorbídeos, como *A. bahiensis* (Dunker), *Tropicorbis janeirensis* (Clessin), *Drepanotrema cultratum* (d'Orbigny), *D. cimex* (Moricand), *D. anatinum* (d'Orbigny) e outras.

Considera o autor que os resultados já conseguidos mostram que o combate microbiano aos planorbídeos constitui uma real possibilidade e deve ser tentado por toda parte e contra todas as espécies responsáveis pela transmissão das esquistossomoses humanas.

AGRADECIMENTOS

E' com satisfação que o autor agradece: ao Dr. Mário Pinotti, pela constante ajuda e estímulo que dele tem recebido; ao Dr. Arlindo Vieira, pela classificação de caramújos de Bambuí; e ao Sr. J. Hill, pela correção da tradução ao inglês e pelas valiosas sugestões que apresentou.

BIBLIOGRAFIA

DIAS, E.,

1953. Estudos preliminares sôbre a esquistossomose mansoni no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. Rev. Brasil. Malariologia e D. Tropicais, **5** (3): 211-214.

DIAS, E.,

1953. Nova possibilidade de combate aos moluscos transmissores das esquistossomoses. Emprêsa Editora "O Éco", Bambuí, 22 pp., janeiro de 1953.

TRANSLATION

Bacteriological Warfare on the Intermediate Hosts of Human Schistosomiasis (*)

At a banch of the Institute in Bambui, Minas Gerais, established in 1943 bâ order of Director H. Aragão with the special purpose of investigating the control of Chagas' disease, research work on schistosomiasis was started in August, 1952. Results of a preliminary survey were reported in October (1).

Some chemical and physical agents have been tried en *Australorbis glabratus,* but soon these experiments were discontinued and research on biological agents was taken up. A few strains of bacteria were isolated from snails and tried on these animals, with negative results.

Then it was assumed that, by means of uninterrupted passages from snail to snail, actually or potentially virulent microorganisms, if present, would be maintained, and their activity would possibly be increased through passages. On September 6, three series of passages were started, each with 5 living snails in 250 cc of water; to two, undetermined cultures were added, and to one nothing but 5 ground up snails. At first, every three days the molluscs were ground and suspended in 250 cc tap water with 5 fresh snails from natural colonies; later passages were made the same way every two days, but no more bacterial culture was added after the first passage. Later on, many other series of passages were made and it was noticed that some of them were more active than others, and that snails that are about to die sometimes showed certain typical signs. From the ovotestis of such snails

(*) Paper read before the V International Congresses on Tropical Medicine and Malaria, Istanbul, August 28 — September 4, 1953. (With 5 additional figures).

(picked out after transverse semi-section of the shell, the animal and the organ being several times washed in ether), bacteria have been isolated by cutting off the posterior extremity of the ovotestis, pressing the surface of section lightly on agar plate and streaking.

Since the bacteria thus isolated were apparently the first ones to penetrate the host's tissues, they were supposed to be responsible for death of the animals in the series of passages. They were cultivated in ordinary broth and tried in the field. with preliminary results that were considered very promising (2).

The species most frequently isolated is a non-pathogenic *Bacillus*, conventionally called BET (*bacilo de espóro terminal*), which has been studied in cooperation with Dr. O. Cruz Filho and that is aparently a new species. For now it will be sufficient to state that it is Gram variable, motile, and has a terminal spore (fig. 1); pleomorphic, aerobic, mesophylic; proteolytic, indol-forming; does not ferment ordinary carbohydrates; acetyl-methyl-carbinol, negativ; salt tolerant; optimum pH 7.0 to 7.2; not pathogenic for animals even at massive inoculations.

A few series continue to be maintained in order that an increased activity of BET may be obtained.

The first trials in the field were carried out in small pools, for materials necessary for preparing large amounts of culture were not then available. The results have been partially published (2); further observation showed that in 6 artificial pools into which living molluscs were introduced a mortality of 100 percent was reached, as well as in 6 additional similar pools. As to the first three natural foci, results so far are as follows.

Focus 1 — Volume 1,466 litres of water; treated with 5 litres of culture: after 214 days, 99.8% mortality (total dead counted 4,060, still living 8). Living newly born snails were seen many times, but they died in few days.

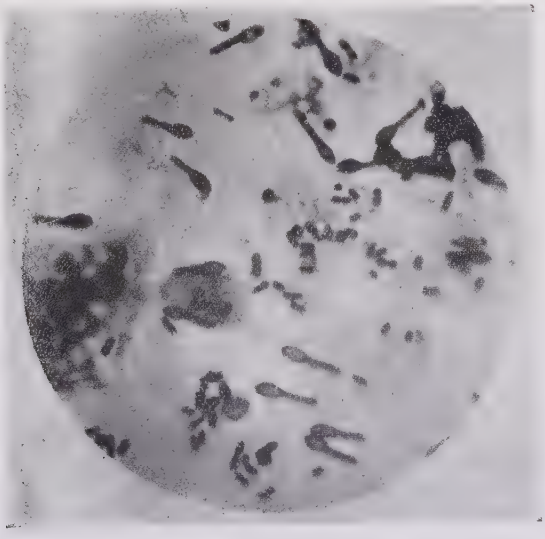


Fig. 1 — *BET bacillus*

Focus 2 — Volume 680 l., treated with 3.5 l. of culture: 100% mortality after 59 days (total dead 693); on the 69th day after treatment, fresh snails were introduced into the pool and 100% mortality was obtained on the 174th day after treatment. BET has been iselated from water and living snails over 6 months after treatment.

Focus 3 — Volume 260 l., 7 l. culture: 100% mortality on the 140th day.

The following example shows that mixing powdered peptone to cultures at the moment of use is quite effective:

Focus 25 —— Volume 1,020 l., 15 l. culture plus 1 pound peptone: 100% mortality in 12 days (natural colony). Fresh snails were introduced on the 30th day and the mortality was 95.1% on the 106th day.

Fig. 2 — *Focus* 25, *twelve days after it has been treated with culture and peptone* (100% *dead snails*). *Dr. Arlindo Vieira* (*center*) *and the writer.*

Addition of peptone was made not only because it improves nutrient conditions of the medium, but also because whole proteins are probably not attacked by bacteria unless traces of peptone are present. Probably the effect of BET on molluscs depends upon the elaboration of proteolytic enzymes. Since proteolytic bacteria have been isolated from apparently normal living snails, the following experiment was made:

Focus 45 — Volume 185 l., treated with 1 kg peptone plus 100 ground up snails: 100% mortality in 8 days. Living snails introduced on the 12th day, 100% mortality on the 17th day; again fresh snails introduced en the 25th day, 100% mortality on the 28th day.

Pure peptone was added to two small natural breeding places. All molluscs were dead after 7 days, when the first examination was made. In the laboratory also the lethal effect of peptone upon snails is easily shown, death taking place in one or two days, according to concentration. On the other hand, BET's effect on snails is rather slow, the bacillus taking some-

times even 4 weeks and more to kill all the snails, if the dead ones are removed as soon as they die. But this process can be speeded up by increasing the concentration of bacteria.

In order to see the effect of pure peptone and of peptone plus BET upon *A. glabratus*, two similar series of dilutions, of 100 cc each, were made with peptone, from 1:100 to 1:102,400 at 50% intervals. In one of these series 1 cc of BET culture was added to each dilution. Three snails were placed in each flask of each series. In the peptone plus BET, they died in 2 to 7 days at all dilutions, but in the peptone alone this occurred only up to dilution of 1:3,200; higher dilutions taking from 11 to 30 days to kill all the snails, which were removed as seon as they died.

The following two experiments show that snails may be killed very simply, using nothing but water and snails:

Focus 16 — 81 living snails were collected from a breeding place in which a high rate of spontaneous mortality had been observed, and were placed in 1 litre of tap water. They were kept in the laboratory for three days, when 36 of them were dead. This litre of tap water containing 36 dead and 45 living molluscs was then added to an artificial pool containing 200 snails in 81 litres of water (2). At the end of 13 days all snails were dead. They were removed from the pool and 100 fresh snails were added. After 52 days anly two living snails were found.

Focus 20 — 90 snails were collected from another breeding place and were kept in the laboratory in 1 litre of tap water as before. At the end of 6 days 73 of them were dead. This tap water plus the 90 snails was then thrown in an artificial pool containing 100 snails in 53 litres water. At the end of 45 days all the molluscs were dead. Of 100 fresh snails which were then added only three remained alive on the 185th day after treatment. These results would probably be improved if peptone and culture were added to the water containing the snails.

Large scale trials

For practical purposes, large amounts of culture media (ordinary 1% peptone water or meat extract broth) may be conveniently prepared in drums of 200 l. capacity. Since perfect sterilization is not necessary, it is sufficient to boil the medium for a few minutes, then adjust pH to 7.2 to 7.4 and inoculate heavily with pure BET culture after cooling to 50 or 60°; incubation at 37° is not necessary. Good cultures have been made even without boiling the medium, just with moderate heating.

Treatment of large breeding places can be made by simply pouring the culture into the water but it is better to use water pumps or sprayers. Dams or large pools are best treated at borders, on the bottom and on the floating vegetation, if any. Ditches are treated all the way along. Streams should be heavily treated at several spots where there is more or less stagnant water, where conditions are most favorable for the breeding of snails; from such spots, bacteria keep continuously spreading into running water. The more culture and peptone that are used, the better, for not only will the colonies of molluscs be more quickly eradicated, but effective protection against re-infestation will apparently last longer. For intensive treatments, 5-10 kg or more of powdered peptone may be dissolved in each 200 l. drum of culture, just before use. For routine treatments calculation of water volumes is not necessary, provided the water is well infected.

A few examples of treated foci will now be given, from the results so far obtained.

Fig. 3 — *Focus* 19

Figs. 4 and 5 — *Focus* 26

Fig. 6— *Focus 27 on April 19th, 1953 while being treated*

Fig. 7 — *Barrel containing nearly 125,000 shells from Focus 27 (August, 1953)*

Focus 19 — A pond of 160.000 1. capacity, and the nearby spring from which it was fed were both treated on April 8, 1953 with 150 1. of culture and 3 pounds of peptone. Previousty 4,146 shells were collected in 70 days, from February 1st to April 7th. But from April 16th to July 30th, 112 days after treatment, 14,878 dead snails were collected, and on July 30th only 108 living ones were found, a mortality rate of 99.1%. On several days innumerable dead young snails were observed, a fact that did not occur before treatment. The fish were all alive. (Fig. 3).

Focus 26 — A stream and a canal (fig. 4 ond 5) with over 50.000 1. of water were treated on April 7th (150 1. culture and 5 kg peptone); very few shells and plenty of living snails were seen. From April 16 to August 8 (134 days), 4,311 dead were counted and only 9 were found alive on August 8 (99,8% mortality).

Focus 27 — A large pool (fig. 6), 60 m long and 30 m. wide, with an estimated capacity of 2,181,000 1., which was fed from 3 springs, had 3 outlets; the total loss of water from all three outlets was about 600 1. per minute. This was the most heavily infested focus at Bambui, and large numbers of snails, mostly *A. glabratus*, were seen everywhere, the edges especially being rich in newly hatched ones. For several days before treatment, old empty shells were collected, a total of 10,057 being obtaines. Very few young snails were found dead. Treatment was carried out on April 19th, 1953 with 1,943 litres of culture in which a total of 15 kgms of peptone were dissolved. The borders of the pool, the peripheral water, botton and floating vegetation were heavily sprayed. The first dead and dying snails were seen on the 3rd day and their numbers increased daily. On the 11th day the collecting of dead ones was begun; after being counted they were wrapped in gauze and left in the water. Then they became numerous and they were placed in a drum (fig. 7) pierced by a large number of small holes. This was done in order not to waste microbes from the dead bodies. Estimation of living snails was impossible at the beginning and later on it was considered to be unnecessary since the observations would be continued until no more living or dead snails were found; and if the treatment ceased to be effective, repopulation would soon be noticed, since the young snails would remain alive and would mature instead of dying in a few days. The results so far are as follows:

FOCUS 27

Nr. days afteer treatment	Nr. collected dead snails	Total dead snails
11	942	942
12	1,305	2,247
13	1,558	3,805
14	1,820	5,625
15	2,607	8,232
25	5,406	13,638
41	8,916	22,554
48	7,213	29,767
55	6,914	36,681
62	9,097	45,778
69	11,616	57,394
76	10,901	68,295
83	13,853	82,148
90	7,862	90,010
97	10,563	100.573
104	10,526	111,099
111	13,753	124,852
118	14,771	139,623
125	15,879	155,502

Living snails are now difficult to find in the pool, and the young ones that existed before in large numbers at the edges have entirely disappeared for several weeks. It should be borne in mind that only the collected snails have been counted, so many more must have died that have not been found, especially small ones. The fish all remain alive. Another important fact is that the snails also disappeared from the streams that arise from the pool, although they had not been treated directly. This effect at a distance in running water has also been observed in other treated foci. BET has been isoloted many times from dead and living snails from the pool ,as well as from the water and from living fish. Besides *A. glabratus,* the lethal effect of this bacterium has also been observed em other molluscs, such as *A. bahiensis* (Dunker), *Tropicorbis jancirensis* (Clessin), *Drepanotrema cultratum* (d'Orbigny). *D. cimex* (Moricand), *D. anatinum* (d'Orbigny) and others.

It is considered that the results so far obtained show that the bacteriological warfare on snails is a real possibility. It should be tried everywhere and on all species that are responsible for the transmission of human schistosomiasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Dr. Mario Pinotti for his help and encouragement during the course of the experiments, Dr. Arlindo Vieira for the classification of snails and Mr. J. Hill for his assistance with the translation and for his valuable suggestions.

BIBLIOGRAPHY

Turn back to end of Portuguese text.

Sôbre a Patogenia da Gangrena Gasosa

por

Genésio Pacheco

Denomina-se gangrena gasosa a necrose devida à proliferação microbiana em consequência de lesões traumáticas e alterações fisiológicas que facilitam a multiplicação microbiana de germens anaeróbios. A denominação serve para distingui-la de outras gangrenas, não infecciosas, ou infectadas posteriormente mas por germens de outros grupos.

Os anaeróbios da gangrená gasosa são em numero reduzido e filiados às bacterias do gênero *Clostridium*.

As circunstâncias determinantes do processo infeccioso são variáveis durante a guerra e na paz, no deserto e nas regiões pantanosas, no frio e no calor, no tempo e no espaço, em intervenções cirúrgicas, em alterações de origem medicamentosa irritativa para os tecidos, mas no fundo subsiste a noção que a lesão textural é o fator condicionante essencial, adicionado a outros, capazes de promover alterações locais, favorescentes da proliferação bacteriana anaeróbica.

A simples presença dos germens num ferimento não basta para fazer irromper um processo de gangrena gasosa, se não coexistem lesões texturais, particularmente lesões musculares, gerantes das condições acima. Seria a infecção um processo local com repercussão geral. Entretanto, considerando o modo de ação dos outros clostrídios patogênicos produtores de toxinas e doenças essencialmente neurotóxicas, empreendemos uma série de pesquisas no sentido de apurar se os germens da gangrena gasosa não atuavam de modo análogo, isto é, não provocavam também doenças neurotóxicas.

Formas Clínicas e Sintomatologia

Os sinais clínicos da gangrena gasosa se manifestam pelo aparecimento de manchas e descoramento cutâneos, edema gasoso, e às vêzes, uma rêde venosa de estase, desenhada na pele e que se espalha à distância do local afetado. Do ferimento corre secreção mucopurulenta, e seus recessos e pertuitos se enchem de pús. O líquido do edema à amarelo ou hemorrágico. Na superfície cutânea edemaciada formam-se bôlhas, de tamanho variável, cheias de líquido sanguinolento, prenhes de clostrídios.

A zona lesada torna-se em curto tempo timpânica, túmida e dolorosa. Os músculos alterados tomam coloração amarelo escuro, com zonas de aspecto de carne cosida, ao lado de outras apresentando textura com aparência desorganisada, e infiltrada por um exsudato úmido. Em tôrno da parte lesada observam-se manchas descoradas, ou de côr vermelho escuro, representando zonas de mortificação, sêcas ou úmidas, com bôlhas gasosas de permeio, lembrando tecido pulmonar e crepitante à palpação.

A quantidade de gás é variável, chegando a ser mesmo nula em certos casos, tornando-se abundante após a morte, como resultado da continuação da atividade proliferativa e metabólica das bactérias e, necessariamente, crescendo a sua produção com o tempo decorrido.

Quando a lesão se aprofunda até os ossos, ou estes foram interessados na lesão desde o início, o periósteo se destaca, permanecendo inalterado, apezar disso.

As veias subsidiárias em tôrno se trombosam e, quando outros germens aparecem, além dos da gangrena gasosa e a êles associados, as veias se tumefazem mais ou menos consideravelmente.

Nos ferimentos proximos das articulações estas se edemaciam.

Produzem-se hemorragias nas serosas.

Por fim, deve ser assinalada a formação de edema tão extenso que Aschoff propõe substituir a designação gangrena por "edema gasoso" para a afecção, expressão já usada por Sacquepée, em 1951.

A tão graves e extensas alterações o estado geral não é indiferente. Observa-se prostração, esfriamento das extremidades, elevação da temperatura, dores locais, pulso rápido e irregular, náuseas e vômitos, descoramento periférico.

Permanece íntegro o entendimento, mas o paciente aparenta anciado ou com o *facies* de terror.

A morte é precedida de delírio, seguido de coma, quando não é súbita, decorrendo de falência cardíaca, sobretudo se os doentes são movimentados em transporte ou durante a anestesia. STAMMERS acrescenta que as extremidades azulecem ou se apresentam manchadas, por dificiências circulatórias, e depois se tornam escurecidas em consequência de derrames hemorrágicos.

ENRYS ROBERTS & COWELL distinguem na gangrena gasosa 3 tipos clínicos: 1) *comum,* ocorrendo 12-24 hs. após a lesão; 2) *fulminante,* em que a morte pode ocorrer dentro de poucas horas; 3) *prolongada* de início, evoluindo em dias até semanas.

1) No tipo comum o doente de começo apresenta febre, pulso freqüênte, o ferimento aparenta mau aspecto e cheiro desagradavel. Poucas horas depois o paciente torna-se pálido, por fim ictérico e com aspecto de completo abatimento. A língua é seca e suja, o pulso imperceptivel, a respiração rápida, sobrevêm vômitos e por fim hemorragias.

O equilíbrio psiquico é mais ou menos conservado mas, por vezes, aparece delírio. Nas gangrenas musculares profundas, como na das panturrilhas, ocorre mais vezes uma lesão vascular macissa, a isquemia favorecendo a anaerobiose local e facultando a necrose de todo o membro.

No final do processo local a palidez de pele é substituida por um rubor azulado, que se torna violeta escuro e se espalha rapidamente em tôrno da ferida. Em seguida os tecidos começam a desagregar-se e a sofrerem putrefação de côr verde ou negra. O aparecimento de gás pode ser considerado um fenômeno tardio.

Nestes casos a morte ocorre dentro de 12 a 24 horas depois do ferimento primitivo.

2) No *fulminante* a seqüência é muito mais dramática, a morte podendo alcançar o paciente dentro de poucas horas após o ferimento. Somam-se, para facilitar a gangrena fulminante, o choque, a hemorragia e o esgotamento.

O paciente mostra-se pálido, frio, agitado e, às vezes, tem vômitos. Mucosas cianosadas, pulso fraco ou imperceptivel. Examinado o ferimento mostra o aspecto de músculo morto, tendo modificações de côr como acima e formação de gás.

Em 40 casos estudados por FRAENKEL & COL. a maioria teve evolução fulminante.

3) No tipo prolongado o aspecto é de uma gangrena atenuada, com tendência à cura.

Descrevem ROBERTS & COWELL alterações nos ferimentos indicativos da formação da gangrena gasosa: 1) Nos ferimentos penetrantes, com ou sem fratura óssea, interessando ou não os vasos; 2) nos ferimentos externos, superficiais, com grande laceração de tecidos musculares e fartamente contaminados.

No primeiro caso os músculos são pálidos, frouxos, e o ferimento é coberto por um exsudato viscoso, amarelo-esverdeado. No segundo tipo o ferimento é vermelho escuro, depois empalidece, passa a verde, e por fim, escurece. Essas alterações decorrem das contusões, produtoras de hemorragias intersticiais, o sangue derramado sendo posteriormente decomposto pelas bactérias. Freqüêntemente encontram-se coágulos sanguíneos em tôrno dos músculos, os quais são importantes na disseminação do processo infeccioso.

A princípio a lesão é resistente ao toque, e a parte morta do músculo parece cozida ou endurecida pela existência de fibrina coagulada. Não há formação de pús, escapando da ferida um líquido claro, de cheiro fétido.

Abaixo das bainhas fasciais (1) encontra-se uma camada de linfa turva, esverdeada, a qual também é encontrada em volta dos nervos. Evoluindo o processo, a zona endurecida amolece, a superfície se torna crepitante à palpação, e abaixo dela os tecidos tornam-se escuros e deliquecentes.

No começo da infecção os músculos apresentam-se mais firmes que o normal e não contráteis. Não ha mudança de côr, mas perdem o brilho e a translucidez. Logo depois, com o progresso da infecção, aparece mudança de côr. O tom vermelho se acentua e passa a róseo, depois cinza, verde, por fim negro. Quando vários músculos são afetados podem-se encontrar todas essas cambiantes de tonalidades.

A produção de gás se inicia em tempo variável após a morte do músculo, usualmente após algumas horas, e deve ser considerada manifestação tardia. Começa com a produção de bôlhas pequeninas que se fundem, e rapidamente aumentam de volume, dando ao músculo aparência esponjosa ou de molde de casa de abêlha. Quando a produção de gás aumenta, êle força os planos de menor resistência, sobretudo da superfície do músculo, distendendo suas bainhas, aumentando a isquemia muscular, facilitando, com isto, a disseminação do processo subcutâneo, estendendo-se às vezes a todo corpo.

(1) de fascia, bainha muscular.

Parece que a trombose macissa não é indispensável ao processo de necrose porque observaram HENRY-ROBERTS & COWELL um caso de gangrena na perna, em que a poplitéa mostrava-se permeável até as últimas modificações, tendo sido injetada com suspensão de sal de chumbo logo após a morte para essa verificação. A isquemia fôra devida à pressão mecânica dos gases.

Muito além da zona lesada, quando houve traumatismo, há hemorragia intersticial traumática, à distância consideravel do ferimento.

O processo gangrenoso se dissemina pelas bainhas musculares e circunscreve-se ao músculo, a menos que alterações vasculares e a produção de gás não façam propagar-se a infecção por um mecanismo apreciável à simples vista, e sob duas formas: 1) paralização do processo invasor na superfície da ferida; 2) limitação a uma zona apreciável do músculo invadido.

Uma linha de demarcação separa a parte afetada da outra parte do músculo vivo e contrátil. Êste aspecto não corresponde a nenhuma barreira leucocitária ativa. Algumas vezes encontram-se numerosas pontas de lança do processo infeccioso, distendendo-se pelo músculo ao longo do curso dos vasos sanguíneos, separando-se da parte sadia como faixas de músculos mortos.

HISTOPATOLOGIA

As alterações histológicas devem ser consideradas: na superfície da ferida, na área do músculo morto, na zona de invasão e nos pontos de resistência ou de regeneração.

Na necrose do músculo êste se apresenta distorcido, tumefeito, com fibras fragmentadas, bainhas perifibrilares embebidas por massa de fino retículo fibrinoso, em cujas malhas há numerosos leucocitos polinucleares, de mistura com bactérias, restos nucleares e sangue extravasado. Bactérias e fragmentos de músculo se encontram em processo de fagocitose em plena atividade. Os vasos são lesados por freqüêntes tromboses. A área em tôrno dos vasos fica freqüêntemente indefinida pelas lesões destrutivas dos músculos e das paredes vasculares. O retículo envolvendo os leucócitos dos tecidos impede a formação de pús.

Nos casos menos avançados o exudato fibrinoso penetra profundamente na camada muscular lesada subjacente. Nos estádios mais recentes ainda, o reticulo de fibrina só é visível microscópicamente, e a presença de leucocitos é característica. Na zona de invasão, entretanto, os leucocitos vão se tornando raros, devidos às leucocidinas das toxinas anaeróbias.

O retículo fibrinoso, embora característico, não é exclusivo da gangrena gasosa, sendo encontrado também nos processos infecciosos por outros germes anaeróbios. Tem significado de diminuição da resistência local.

A ação específica da toxina gangrenosa aparenta ser miolítica por excelência, agravada pelas condições locais: traumatismo, hemorragias, estravasamento de líquidos vasculares.

As fibras musculares se alteram de tal modo que perdem a estriação e a colorabilidade. Freqüentemente entumecem, destroem-se, fragmentam-se,

fendem-se longitudinalmente e se separam do tecido intersticial por espaços perifibrilares. Seus detritos acabam sofrendo fagocitose. A miólise é, às vezes, total.

O retículo fibrinoso encontrado no ferimento e nos músculos é perifascicular ou perifibrilar. Os leucócitos envoltos por êle decrescem rápidamente em número, a medida que se caminha para a zona de invasão, onde o retículo fibrinoso se atenua e é substituido por líquidos, produzidos provàvelmente por extravasamentos capilares.

A separação entre a parte sã e a tocada é visível, mas não significa que a primeira não esteja no início de alterações e a segunda esteja completamente alterada.

São também vistas alterações das paredes vasculares nas zonas não traumatizadas, imputáveis à ação lítica da toxina e concomitantes às alterações vasculares. Onde não mostram lesadas fibras e vasos êstes extravasam leucócitos em abundância.

A parte mais interessante a examinar é a zona de invasão gangrenosa. Aqui a proporção de fibras mortas para vivas é inversa. De começo a fibra se tumefaz, perde a estriação e a colorabilidade, e é envolta por um líquido perifibrilar. Êste, depois, desaparece e faz a fibra tumefeita aproximar-se da fibra sã pelo aspecto. Nessa zona pode-se distinguir o aparecimento de uma estria bem delimitada que marca a zona de invasão.

Nem sempre, entretanto, esta limitação pode ser feita histológicamente, mas sabe-se que ela representa a zona de invasão porque aquem dela há sempre germes, além eles não são encontrados, e, se existem, são destruidos. Sómente nos casos graves, em que as defesas orgânicas falham, êles podem proliferar na zona sã e criar fócos metastáticos para lá da zona de invasão.

A toxina se encontra nos espaços perifibrilares, sendo absorvida pelo músculo e segue o trajéto das fibras musculares, degradando-a até sua morte ou destruição. Eis o motivo do progresso rápido do processo gangrenoso que somado à redução da resistência resultante do choque traumático e da hemorragia, promove a progressão e espontânea e rápida do processo infectuoso.

A zona de resistência que se encontra após as intervenções cirúrgicas revela que se forma camada leucocitária separando a parte não alterada do processo em regressão.

Nos casos de regressão espontânea da gangrena gasosa essa formação leucocitária é também observada.

O aumento de leucócitos significa ausência da toxina que é lesiva para leucócitos, vimos acima.

Taylor atribui acentuada importância aos gases na patogenia da gangrena, pela ação compressora exercida por êles sôbre os vasos, reduzindo a nutrição dos tecidos e facilitando a proliferação clostridiana. Sendo a produção de gás inconstante, aparecendo sua maior quantidade tardiamente, a hipótese é injustificada, comentam Enrys Roberts & Cowell.

Papel predominante no processo gangrenoso atribue Bashford às alterações vasculares.

O exame histológico das lesões revela modificações predominantes na musculatura, que apresenta alterações degenerativas, desde simples degeneração turva até degenerações granulosa e cérea, com destruição final das fibras musculares e desaparecimento da estrutura muscular, encontrando-se ainda depósitos de fibrina entre fibras musculares alteradas.

Os sinais e a gravidade das alterações estão na dependência da extensão do fermento ou do traumatismo, da sua natureza, do local, das condições higiênicas, da resistência orgânica, da toxidez do germem, da associação bacteriana, do tempo de infecção, das complicações, particularmente da septicemia ou piemia, e da formação de fócos metastáticos à distância.

O que distingue mais salientemente a gangrena gasosa das outras infecções bacterianas experimentais é a rapidez de seu desenvolvimento, levando à morte e à violenta formação de processos edematosos em curto tempo.

No homem, assinala FRASER, não é raro sobrevir a morte dentro de 24 horas após o ferimento, ou do começo da infecção. Procura êle estabelecer uma correlação entre essa evolução tão dramáticamente rápida e a extrema atividade da toxina do perfringens e do vibrião sético. Chama êle atenção que a toxina tetânica, sendo mil vezes mais forte que as dos germes da gangrena gasosa, não consegue, entretanto, matar animais antes de 24 horas, salvo quando concentrada ou cristalisada, ao passo que as toxinas dos germes da gangrena gasosa podem fazê-lo em tempo excessivamente curto.

PATOGENIA DA GANGRENA GASOSA

Muito contribuiu a infecção ou a intoxicação experimental para conhecimento do mecanismo patogênico do processo gangrenoso que a observação clínica simplesmente. Pode-se dizer, mesmo, que as provas experimentais, esclareceram quase tudo na gangrena e ajudaram na sua profilaxia e terapêutica.

As verificações necroscópicas em indivíduos mortos de gangrena gasosa deixaram antever os processos alterativos locais que foram depois esmiuçados exaustivamente pelas experiências em animais de laboratório.

Realmente, assinala KETTLE, o exame histopatológico das lesões, nos casos humanos, não é favorável ao estudo do mecanismo da gangrena, porque as alterações nestas condições são essencialmente degenerativas e devidas a outras causas tais como alterações *post-mortem*, efeitos de associações bacterianas, lesões traumáticas texturais devidas a demora na necrópsia, realisada em geral muitas horas após a morte, acarretando por si mesma alterações degenerativas estruturais. Muito concorrem para alterar o quadro histológico da gangrena gasosa as infecções secundárias, demasiado freqüêntes na gangrena gasosa natural.

No material humano encontram-se associadas, por isso mesmo, lesões que não se sabe se representam alterações cadavéricas. Com o emprego da infecção experimental não só ficam afastadas essas causas de erro, senão também pode-se modificar à vontade as condições da experiência, utilizando vários germes da gangrena, sós ou associados, em amostras mais virulentas, ou pouco virulentas, ou ainda empregando toxina pura.

De outro lado, as alterações locais e gerais observadas nas infecções experimentais em animais de laboratório quase se superpõem àquelas observadas na infecção humana, justificando assim a razão do conceito de identidade das lesões e a generalização, no homem, das alterações observadas experimentalmente.

Nas provas de infecção experimental de FRASER, o aspecto geral foi análogo ao do homem: produção de edema gasoso, invasão rápida dos tecidos pelas bactérias, septicemia e toxemia até final. Diferenças por acaso observadas dependeram apenas do animal em prova.

O estudo ecológico da gangrena, nos seus múltiplos fatores concorrentes, revelou que umas condições lhe eram favoráveis, enquanto outras eram até essenciais à proliferação no organismo dos germens causadores. Acentua FRAZER existirem na guerra tipos peculiares de ferimentos, nos quais há laceração dos tecidos, ou em que ficam retidas no interior dos ferimentos fragmentos de vestes ou de madeira; nas contusões, nos ferimentos torturosos com esmagamento; naqueles em que se processam derrames sanguíneos, trombose de vasos; nos ferimentos comprimidos em excesso por aparelhos cirúrgicos e conseqüente insuficiência circulatória geram-se condições particularmente favoráveis à infecção gangrenosa.

Tais fragmentos, detritos texturais ou aparelhos cirúrgicos defeituosos promovem modificações físicas locais essencialmente favoráveis à proliferação de germes anaeróbios, quando êles são presentes, particularmente fazendo baixar o coeficiente de oxiredução ou Eh dos tecidos orgânicos. Essa modificação foi vista experimentalmente, em provas bacteriológicas, essencial à proliferação dos germes anaeróbios no organismo. A presença do oxigênio influiu na atividade patogênica viram PACHECO & COSTA, parecendo que destruindo parcialmente os germes.

Tão importante é essa condição no mecanismo da gangrena que os ferimentos superficiais, ou de locais em que possibilidades de formação de espaços mortos é reduzido, como nos músculos costais, na superfície craneana, raramente são séde de gangrena.

Não sendo removidos os tecidos mortos,os detritos e as impurezas, a gangrena progride, mesmo que se procure introduzir oxigênio por via parenteral ou respiratória, para modificar sua concentração como fizeram experimentalmente OZORIO DE ALMEIDA & PACHECO.

Afora estas condições, outras concorrem para facilitar a infecção gangrenosa e são dependentes da espécie bacteriana em causa, da associação de germens outros que não os clostrídios da gangrena gasosa, e do próprio paciente.

As várias espécies de clostrídios gangrenosos possuem atividade proliferativa e toxigenia diferentes umas das outras, e imprimem ao processo infectuoso conseqüente, aspectos clínico-patológicos também diversos. Enquanto as gangrenas em que domina o *Clostridium perfringens* apresentam-se mais ricas de gás, mais edematógenas, aquelas causadas pelo *Cl. histolyticum* mostram um desgaste e uma desorganização textural impressionantemente maiores, quando não dominantes no quadro patológico.

A presença de outros germens de associação, anaeróbios ou não, freqüentes nas gangrenas, determina modificações no quadro patológico e na

sua evolução, assinalaram WEINBERG & COL. Essa influência pode agravar ou diminuir a atividade patogênica dos germens da gangrena, afirma FREI.

Ainda influem na produção e na evolução da gangrena gasosa as condições do paciente, sobretudo na guerra, ou nos acidentes graves como nos desabamentos, desastres, e outros desse tipo, nos quais os acidentados sofrem abalos capazes de lhes alterar o equilíbrio nervoso com reflexos no organismo e sua defesa à infecções. De outro lado, organismos desnutridos, desvitaminados, com desequilíbrio nervoso, são mais sujeitos à gangrena, por menos resistentes às infecções em geral.

A tendência dos patologistas, pois, é fazer da gangrena gasosa uma infecção predominantemente local, com repercusão geral secundária.

FRASER afirma que os germes da gangrena gasosa se propagam através os músculos, e, menos ativamente, pelos tecidos areolares que os envolvem, embora, diz êle, nem todos os músculos sejam igualmente apropriados àquela disseminação, sendo mais favoráveis os músculos de fibras longas como os glúteos. CALLENDER & COL. acreditam que a gangrena gasosa seja uma doença dos músculos, explicando essa preferência pela riqueza em glicogênio e glutation do tecido muscular, substâncias favorescentes ao crescimento dos clostrídios.

A hipótese de ser sempre o músculo a séde inicial do processo gangrenoso, e que sem êle não há produção de gangrena, não foi confirmada pela experimentação. E' mais fácil, comentar FRASER, produzir a gangrena experimental pela inoculação subcutânea do que pela via muscular. A via venosa produz no coelho uma generalização do processo infectuoso e morte dentro de 24 a 48 horas.

Realmente, parece extranho que se conceda ao músculo essa preponderância de localização dos germes, existindo ali abundância de oxigênio necessário a função muscular, gás esse desfavorável ao crescimento dos anaeróbios. Mas é que estão também ali presentes glicogênio e glicose, fornecedores de energia e dotados de ação redutora, favorável àqueles germens.

Assinala FRASER que os germens invadem primeiro o músculo, e nele se infiltram, atingindo os seus limites, acarretando nas fibras musculares alterações progressivamente crescentes, até sua destruição.

Essas alterações predominam nas fibras musculares, sendo relativamente poupados os tecidos em tôrno e os vasos sanguíneos, que só posteriormente são atingidos.

Os trabalhos fundamentais sôbre a gangrena humana e experimental foram realizados na Alemanha, nos começos do século. Descreveram Von HIBLER, KITASATO, KITT, KLEIN e outros, exaustivamente, as lesões macro e microscópicas observadas em vários animais de laboratório, sob forma de edema soroexsudativo, hemorrágico e necrótico, com enfisema dos tecidos e infiltração celular. Ao lado da infiltração serosa, encontram-se lesões hemorrágicas que embebem os tecidos.

Certa coincidência procura estabelecer Von HIBLER entre a produção de gás e a necrose, mostrando que nos pontos onde há formação de gás os núcleos celulares se apresentam parcial ou totalmente descorados. Os músculos aparentam necrosados, de coloração acinzentada ou amarelada, com zonas de amolecimento e distensão pelos gases. Necrose mais avançada processa-se no local da inoculação.

Assinala ainda Von Hibler diferenças nas alterações produzidas pelos diversos germens da gangrena, atribuindo-as a variações específicas dos germens da gangrena, mais bem dotados uns que outros de energia vital, de utilização dos componentes texturais na sua nutrição, de influências locais, da riqueza protêica, da concentração iônica. Daí derivam, certamente, as diferenças encontradas na gangrena experimental em vários animais de laboratório.

No estudo das alterações texturais Von Hibler assinala que tal qual sucede nas outras doenças infectuosas, há na gangrena gasosa alterações viscerais, observadas no coração, baço, fígado, rim e outros órgãos, caracterizados por tumefação turva, degeneração gorda, anemia ou hiperemia, ou mesmo hemorragias e edemas decorrentes de alterações circulatórias.

No particular das lesões musculares refere êle tumefação turva da fibra muscular, tumefação hidrópica, vacuolização com degeneração hialina e cérea, e desorganização da estrutura muscular com desaparecimento da estriação e formação de massas de amolecimento, alterações anteriormente vistas por Zenken e por Valdéyer. O miolema mostra-se retraido da fibra, separando-se do sarcolema em fragmentos, enchendo-se de líquido os espaços vasios deixados por êle. A colorabilidade da fibra e do núcleo se modificam. Granulações de pigmento formam-se e se depositam nos tecidos.

Entre os tecidos, desorganizados ou lesados encontram-se os bacilos da gangrena.

Combiesco inoculou culturas de *Clostridium histolylicum* em animais e encontrou alterações musculares com um edema dissecante das fibras musculares, desacompanhado de sinais inflamatórios no local inoculado. Êsse germen é dotado da toxina mais potente dos clostrídios gangrenosos.

Em seus estudos sôbre gangrena experimental em cães, Favata & Col. encontraram alterados principalmente os músculos, inclusive o músculo cardíaco, e o fígado.

No local da inoculação havia extenso edema formado de um líquido sanguinolento, que banhava os músculos, e bôlhas de gás na superfície. A massa muscular apresentava-se necrosada, manchada, tendo largas bôlhas de líquido acizentado, pús e tecido necrosado. Nos animais sobrevivendo por mais de 48 horas os músculos foram destruidos, restando a pele, os vasos, os nervos e o tecido conjuntivo. Microscópicamente os músculos apresentavam massas difusas de fibrina e hemátias degeneradas. O músculo cardíaco exibia aspecto brilhante, e histológicamente fragmentação moderada, até grave, das fibras cardíacas, com perda da estriação, palidez e degeneração granular com finos grânulos. Vacuolos freqüentes dentro das fibras, ocasionalmente necrose muscular.

Fígado congestionado, com distensão dos sinusoides e da parte central do lóbulo. Minúsculos fócos necróticos isolados, edema e áreas necróticas disseminadas por todo o órgão.

Examina Lillier as lesões promovidas pelo *Clostridium sordelli* (*bifermentans*), e assinala, além de congestões e hemorragias viscerais, trombose nos vasos sanguíneos do fígado, do rim e das suprarrenais. Mais importantes nos parecem as lesões encontradas nos gânglios e na medula óssea e ausência de leucocitose. Foram encontradas hemorragias e alterações destrutivas nos órgãos linfóides.

Robb Smith explorou a questão da reação inflamatória, bem verificada nas lesões locais, introduzindo os germens juntamente a várias substâncias, e sacrificados os animais em vários tempos, inclusive as testemunhas, inoculadas com toxina sem germens. As lesões mais acentuadas no espaço de 5 horas da inoculação foram: dissociação do tecido conjuntivo, cujas fibras colágenas se apresentam tumefeitas e fragmentadas, destruição dos fibrocitos, histiocitos, reticulocitos, tanto nos pontos onde havia multiplicação bacteriana quanto em pontos distantes dêstes, nas margens da lesão ou mesmo além delas, onde os germens não eram presentes. Com 10 horas de inoculação os vasos mostravam-se trombosados, e desse tempo em deante a dissociação e a dissolução dos elementos celulares conjuntivos se fazia progressivamente. Em toda a parte lesada havia trombose vascular, com produção de fibrina. Nos animais injetados com sulfanilamida, juntamente aos germens da gangrena gasosa, encontravam-se acúmulos leucocitários na periferia da lesão, nos espaços com tecido conjuntivo e sob a pele em tôrno dos músculos lesados. As lesões musculares encontradas por êle nos animais mostraram que o caminho da disseminação bacteriana parece ser o músculo, confirmando também Mc Nee & Dunn, mas não há dúvida que antes das alterações do músculo, o tecido conjuntivo adjacente se desagrega, e suas lesões são já presentes quando o músculo tem ainda aparência normal.

Convem acentuar com Fraser, que a inoculação com germens puros, sem mais nada, é diferente na evolução da inoculação de germens associados a substâncias auxiliares ou "cooperadoras", necessárias para que a infecção se dê ou possa progredir. A produção efetiva da gangrena só se observa no segundo caso, mas o quadro histopatológico é bem diverso. Os germens injetados ou seus esporos, provocam leucocitose, e são fagocitados pelo mecanismo de defesa orgânica. No segundo caso, isto é, com a infeção de germens juntamente a substâncias auxiliares não há leucocitose e, ao contrário do sucedido no primeiro caso, os elementos de defesa são prontamente destruidos e eliminados, verificou Robb Smith.

A introdução da toxina sem germens promove lesões gangrenosa. Logo, se os germens por si sós nada fazem, juntamente às toxinas, ou estas exclusivamente promovem gangrena, resulta que o processo é uma *intoxicação pura e simples,* pouca importância tendo os germens, relativamente, que apenas funcionam como produtores de toxina. Aliás, esta concepção podia ser admitida pelo que se sabia de outros clostrídios patogênicos, do tétano e do botulismo, que por si mesmo são inócuos, mas com suas toxinas se tornam altamente patogênicos.

Também Favata & Col. assinalam nas infecções experimentais em cães ausência de reação inflamatória, convindo notar que nestes animais, nos quais também conseguiram Ozorio de Almeida & Pacheco doença experimental, para verificar o efeito curativo de 0_2, ela decorre muito lentamente, levando dias para evoluir.

Fraser acentua a significação da dissociação dos tecidos como factor da disseminação do germen, e do fosfolipídeo como acceptor de 0_2, parcialmente removido pela lecitinase que desse geito favorece diretamente a anaerobiose.

Em presença da toxina do *Cl. perfringens* as hemátias se alteram a tal ponto que o papel desse germen na anemia tem sido largamente discutido e até aceito como possível agente da anemia perniciosa de Biermer. Kahn

encontrou no estudo da flora intestinal nos casos de anemia perniciosa predominância do *Cl. perfringens*.

Mac Farland & Mac Clean puderam evidenciar a presença de toxina livre circulante no sangue do gangrenoso, mas pode se admitir sua atuação a distância, asseveram Fraser & Col. A pesquisa não demonstra a existência de quantidades ponderáveis, dizem êles, mas nada impede que pequenissimas quantidades vão-se acumulando e fixando no sistema nervoso central, apezar da inexistência de alterações nervosas, que entretanto podem existir, dizem êles, exigindo observações mais detalhadas.

Friedmann & Elkeles discutem a transposição da barreira hêmato-encefálica (Bluthirnschranke) às toximas gangrenosas. Realmente, parece que muitas toxinas ou substâncias metabólicas neurotóxicas transpõem essa muralha. Os fenômenos neurotóxicos observados em geral nas infecções são dessa ordem: febre, cafeléa, torpor, insônia, agitação, delírio, colapso vasomotor.

Asseveram êles que a toxina gangrenosa não transpõe a barreira hêmatoencefálica mas pode atuar sôbre o cérebro e a medula. Ainda mais, Friedmann & Elkeles introduziram alisarina na circulação sanguinea e esta substância corou a massa encefálica sem corar o liquor, podendo-se admitir a penetração de substâncias no cérebro por via sanguínea. Entretanto, a toxina perfringens, da diarreia tóxica do carneiro ou "lamb disentery", transpõe a barreira hematocefálica.

Procuram ligar aqueles pesquisadores essa propriedade à carga elétrica, que nessa toxina é neutra, enquanto a de outras toxinas que não transpõem a barreira, como as toxinas tetânica, botulínica e diftérica, têm carga elétrica negativa.

Fraser estuda a gangrena gasosa experimentalmente. Observa, de começo que os clostrídios, incapazes de provocar gangrena se introduzidos no organismo, produzem edema e congestão no local onde foram inoculados, encontrando-se os microorganismos em estado de lise no interior dos leucócitos. Se o número de bactérias injetadas é excessivo, então se forma um abcesso ou um processo de necrose, seguido de cura expontânea. Justamente o inverso se observa quando o clostrídio patogênico é injetado juntamente com seus produtos tóxicos. Não ocorre lise nem fagocitose; o germen logo se multiplica e invade os tecidos. Suas toxinas atuam como agressinas, embora seu modo de ação não seja bem conhecido, admitindo-se que certos fatores atuem como auxiliares na infecção, vimos atraz.

Realmente, exagerou-se um tanto ou quanto a influência desses elementos auxiliares da implantação e proliferação dos clostrídios da gangrena no organismo, comenta Fraser, pois que observam-se casos de gangrena gasosa em pacientes nos quais a destruição dos tecidos era mínima e a circulação sanguínea local não fôra em nada perturbada.

Nêste particular Fraser aceita de preferência uma influência favorecedora dos ions cálcio do sólo, admitinda por Bulloch & Cramer, podendo-se conseguir a produção de infecções experimentais fulminantes em animais mediante a inoculação simultânea de cálcio ionizado. Apezar disso, não encontra êle explicação para as infecções tardias, como acontece nas intoxicações cirúrgicas subseqüêntes, passadas semanas ou mêses da primeira intervenção.

Intoxicação

Mais importantes para conhecimento da gangrena são os estudos sôbre os efeitos fisiopatológicos das suas toxinas. No início, só a clínica demonstrou êsses efeitos, pela verificação da existência de ações locais e gerais caracterizantes da gangrena própriamente, e dependentes de repercuções nos centros reguladores do equilíbrio orgânico.

A natureza da toxina influi nas alterações observadas. Raramente no homem ocorre gangrena com um só germen, mas a dominância de um dêles exerce modificações sensíveis na infecção.

Frei distingue dois grupos de produtos tóxicos nas gangrenas:

1) produtos tóxicos coloidais, antigênicos, portanto de natureza protêica :

2) produtos não coloidais, não antigênicos, produzidos pelos clostrídios ou por outros germens, do grupo das aminas tóxicas.

Não depende a atividade tóxica de capacidade proteolítica, até porque, diz Frei, nos meios em que a peptona foi decomposta, não há produção de toxina, e os próprios fermentos bacterianos de alguns clostrídios destroem a sua própria toxina produzida no meio de cultura em que vegetaram.

Frei chama atenção para o fato de que as lesões produzidas por toxina, e os próprios fermentos bacterianos de alguns clostrídios destroem a sua própria toxina produzida no meio de cultura em que vegetaram.

Também chama a atenção para o fato de que as lesões produzidas por toxinas não são gasosas, mostrando que os germens da gangrena não possuem fermentos que decompõem os tecidos com produção de gás.

A presença dos germens no organismo, a par da toxina própriamente, a conta de quem corre uma série de alterações as mais significativas na gangrena gasosa, gera outros produtos de decomposição dos tecidos, certamente influentes ou modificadores do quadro mórbido. Com efeito, tais produtos são significativos, e têm de ser levados em consideração no processo gangrenoso, mormente na repercussão geral sôbre o organismo, porém a ação da toxina fica sendo sempre a base das alterações observadas, o elemento principal da afecção gangrenosa. E' uma situação semelhante à da associação bacteriana,incluida por Weinberg como significativa na gangrena natural, mas concorrente no trabalho dos clostrídios, que permanecem os agentes fundamentais da gangrena gasosa.

Vários pesquisadores assinalaram os efeitos das toxinas gangrenosas sôbre animais de laboratório, facultando uma análise completa das alterações texturais e dos sintomas por elas provocados, resultando ficarem admitidas como responsáveis pelas alterações observadas e pela morte. Dentre esses efeitos poderia-se referir a acidemia assinalada por Wright & Fleming, confirmada por Pacheco & Costa experimentalmente.

Fisiopatologia das Toxinas Gangrenosas

Foram particularmente estudadas por Pasternak & Bengston as alterações anatômicas do coração provocadas pela toxina do *Cl. perfringens*, havendo êles encontrado distenção cardíaca, cujos vasos apresentavam paredes adelgaçadas, exsudato gelatinoso no pericárdio, algumas vezes peté-

quias, mais raramente hemorragias. Entretanto, estas eram constantes microscòpicamente, notando-se infiltração no estroma, alterações na estrutura muscular cardíaca, cujas fibras apresentavam o aspecto de estádios da intoxicação. Coaglutinação e fusão das hemátias, formação de trombos hialinos também eram presentes.

Nas intoxicações prolongadas apareciam hemorragias endocárdicas e pericárdicas, edema intersticial e subendocárdico, moderados.

Apresentavam os capilares alterações degenerativas ao nível dos fócos necróticos, cujo estrôma mostrava-se hialino, homogêneo, translúcido, dentro de 6 horas de intoxicação. As fibras musculares estavam distendidas, com degeneração granulosa fina ou grossa, tumefação, descoramento, desaparecimento parcial ou total da estriação, transversal, ocasionalmente distensão das fibras por vacúolos que afastavam ou dissociavam as fibrilas. Os núcleos das fibras musculares foram poupados, embora se mostrassem pálidos e túmidos. Nos casos de intoxicações prolongadas por 24 horas aparecia deposição de gotículas de gordura em fócos ou em aglomerados no interior do citoplasma. Notava-se degeneração fibrinóide, hialina, esparsa num segmento da fibra ou num grupo delas.

Mais freqüênte, porém era a degeneração cérea de ZENKER, a que atribuiram PASTERNACK & BENGSTON a morte dos animais.

Nas intoxicações em que os animais morreram em curto tempo notaram alterações degenerativas em partes da célula, ou em toda ela, localizadas nos ventrículos, apresentando disposição errática na massa muscular.

A degeneração cérea só é encontrada na intoxicação crônica ou prolongada no tempo, e apresenta-se em fócos ou disseminada. As células são convertidas em massa uniforme, sem estrutura, desprovidas de núcleo e de estriação, fortemente eosinofilas ou intensamente basófilas, ou então resistentes á coloração. Tais massas têm forma de cilindros, salchichas, ou de pérolas em rosário. A musculatura lesada aparenta carne cosida, de aspecto, vítreo ou céreo, fortemente refringente. Outras vezes as alterações ainda se apresentam mais graves, com fócos degenerativos e calcificação, coleção purulenta, enfim, uma verdadeira devastação cardíaca. Em nenhum caso foram vistos sinais de regeneração, revelando a gravidade dos processos de intoxicação.

Os gânglios nervosos cardíacos eram poupados; sómente uma vez em três encontraram alterações degenerativas hialina das células de PURKINGE num dêles; as outras células apresentavam-se tumefeitas, empalidecidas e continham gránulos dispersos no citoplasma.

Embora as alterações vistas por PASTERNACK & BENGSTON não fiquem limitadas ao miocárdio, como vimos, esclarecem elas as verificações de Lautenschläger e de outros sôbre as perturbações funcionais observadas no coração gangrenoso.

PASTERNAK & BENGSTON estudaram também os efeitos da toxina do *Cl. septicum* sôbre coelhos, por via venosa, verificando que a morte dos animais se dá com uma dóse que mata em pouco tempo, e que doses inferiores a estas não matam.

Confirmaram as verificações de LAUTENSCHLÄGER de que doses seguramente mortais, administradas de uma só vez, deixaram de sê-lo quando

divididas em doses repetidas e espaçadas. Outras vezes um animal morria em 2-3 minutos, enquanto outros, injetados com a mesma dose, sobreviviam indefinidamente. O tempo de duração da injeção não parece ter influência nos resultados, contrariando as verificações de LAUTENSCHLAGER e de STRAUB que viram doses mortais tornarem-se inócuas quando introduzidas espaçadamente, admitindo STRAUB que se trate de uma destruição parcial da toxina por oxidação no organismo.

Encontraram PASTERNAK & BENGSTON uma relação quase inversamente proporcional ao volume da dose inoculada, isto é, quanto maior o volume da dose introduzida tanto menor era o tempo de sobrevivência, seja em coelhos seja em camondongos.

LAUTENSCHLÄGER, DALE, BUTTLE & TREVAN estudaram os efeitos fisiológicos da toxina sôbre o músculo caríaco, e obtiveram resultados comparáveis ao efeito digitálico, que certamente concorre no mecanismo da morte. STRAUB confirmou as verificações de LAUTENSCHLÄGER, observando como efeito cardíaco uma queda da pressão sanguínea, seguida de elevação e nova queda progressiva até parada do coração. Acompanhava as alterações cardíacas a respiração, que na sua opinião é um fenômeno secundário.

Verificaram PASTERNAK & BENGSTON que os músculos têm poder neutralizante sôbre as toxinas, mais acentuado pelo músculo voluntário que pelo músculo cardíaco. Por outras vias que não a venosa, a toxina apresenta tendência localística, admitem êles. Verificaram serem necessárias doses consideràvelmente mais elevadas de toxina por essa via para provocar intoxicação.

Entretanto, o mecanismo aí é diferente. A observação mostrou que a toxina atuando mais demoradamente, provoca a ação neutralizante dos músculos, a qual pode correr a conta da oxidação admitida por STRAUB, o que PATERNAK & BENGSTON não previram.

Apresentava o rim degeneração hidrópica, o epitélio tubular semeado de gotículas de substância coloidal, e ocasionalmente necrose de grupos celulares. Uma vez por outra necrose focal nas supurações, no músculo do coração edema intersticial e alguns fócos hemorrágicos. Capilares trombosados, sem alterações das paredes vasculares. Fígado com área de necrose gordurosa, tumefação turva e descoramento das células parenquimatosas.

Nas cobáias as lesões foram mais acentuadas no rim, particularmente nos *tubuli*, cujas células apresentavam hiperemia e destruição protoplásmica, precedida de tumefação turva.

Nos coelhos mortos rapidamente, em 5-10 m., observaram edema pulmonar, com retração arterial. A par dessa lesão havia alterações funcionais que serão examinadas mais tarde.

Resulta, afirma PASTERNAK, que a toxina se difunde a todo organismo, provocando alterações generalizadas à distância, e os resultados observados se aproximam dos encontrados por outros pesquisadores que trabalharam com toxinas não purificadas.

FRASER & COL. inquerem as alterações da toxina perfringens tipo A, *in-vitro*, sôbre os tecidos conjuntivo, muscular, gorduroso, e nervoso (nervo ciático), postos em contacto com a toxina e mantidos na estufa a 37º durante 14 dias. O tecido conjuntivo sofreu amolecimento e fragmentação das fibras colágenas, o músculo apresentava fragmentação grosseira, com pro-

dução de gás, desaparecimento do endomísio, do tecido conjuntivo, dos núcleos do sarcolema, e vacuolização da fibra muscular. Pouca alteração aparentou o tecido gorduroso, embora houvesse arrebentamento das células e desaparecimento da gordura quando se fazia agitação do continente. No nervo ciático notaram fragilidade textural, distorção da camada de mielina e entumecimento do cilindro eixo. Não precisa dizer que em todas as experiências fizeram provas testemunhas, mergulhando fragmentos de tecidos em misturas de toxinas com antitoxina, para neutraliza-la, permanecendo os tecidos inalterados nessas misturas durante aquele tempo.

A toxina por êles injetada no músculo de cobáias determinou alterações do tecido conjuntivo antes de aparecerem as alterações do tecido muscular, notando picnose do núcleo dos fibrócitos, seguida de seu desaparecimento. As fibras colágenas mostravam-se dissociadas e, não raro, fragmentadas. A gordura desaparecera dos espaços intermusculares em poucas horas (6), pela rutura das células gordurosas, e gotículas de gordura apareceram no líquido do edema.

As lesões musculares se lhes seguiram e se mostraram análogas as já conhecidas, aparecendo no perimísio alterações precedendo as do interior da fibra, cuja lesão se iniciava no núcleo.

Tendões e nervos persistem aparentemente íntegros, no meio da massa necrosada, mas acabam sendo também destruídos pela ação da toxina *in vivo*.

Nos vasos há dilatação e trombose, e tumefação do endotélio, mais acentuadas no local da injeção e em tôrno dos gânglios regionais mas são vistas tambem em órgãos distantes, como no pulmão, no baço, particularmente quando a toxina é injetada no peritôneo. A toxina exerce alterações nas hemátias, trazendo como consequência anemia secundária. Estes aspectos histopatológicos são vistos tambem quando se examina material de gangrena gasosa humana.

Um detalhe interessante é a ausência de reações inflamatórias no local onde se processa a gangrena gasosa, embora nos processos crônicos ela possa ser observada, e nos casos humanos seja referida, porém nela interferem os fatores de infecção secundária, constituidos principalmente por germens piogênicos. Mas na gangrena experimental o fato tem sido notado constantemente, tendo sido atribuido à existência de ação impediente ou retardária das toxinas gangrenosas sôbre a mobilização leucocitária.

Outros Fatores da Gangrena Gasosa

Resulta das verificações clínicas e experimentais que a gangrena gasosa altera os tecidos onde se implanta, com especialidade o tecido muscular. Essas alterações são tão predominantes que os primitivos pesquisadores as assinalaram quase exclusivamente nas lesões observadas, a tal ponto que McLeenn classifica a gangrena gasosa como "essencialmente uma infecção dos músculos vivos".

Interessa saber o mecanismo dessa destruição, se depende ela da ação fermentativa ou tóxica, isto é, degenerativa.

E' assim que os fermentos, como lipase, complexos lipoprotêicos, lecitinase, hialuronidase, encontrados por Robb-Smith, são capazes, por si sós, de exercer ação destrutiva sôbre a fibra e os outras elementos da organi-

zação muscular. Com filtrados de cultura isentos de germens ou toxinas pode-se reproduzir experimentalmente as lesões da gangrena, havendo efeito inhibidor quando os filtrados são préviamente neutralizados por antitoxinas, demonstrando claramente que as alterações observadas são promovidas pelas toxinas ou pelos elementos nelas existentes e vistos acima.

Na gangrena gasosa experimental a presença de filtrados ou produtos do metabolismo bacteriano revelou-se elemento essencial na invasão dos músculos pelos clostrídios, filtrados ou produtos tóxicos que por si só são capazes de proliferar e produzír a lesão gangrenosa.

Substâncias tóxicas e enzimas são presentes nos filtrados de culturas de clostrídios, embora não se saiba, afirma ROBB-SMITH, se aquelas existem nos músculos infectados. Delas, a lecitinase é capaz de desfazer a membrana da fibra muscular, bem assim das hemátias, e os líquidos resultantes dessa destruição podem funcionar como fatores de edema.

MACLEAN admite papel saliente da hialuronidase na infecção pelo *Cl. perfringens*, justamente o clostrídio mais freqüente da gangrena gasosa, pela hidrólise exercida sôbre o tecido conjuntivo do intermísio, facilitando com isso a penetração e a disseminação dos germes.

De outro lado ROBB-SMITH observou fragmentação da fibra muscular conseqüente à sua contração, quando não possuia mais o retículo, ou se achava enfraquecida pela ação lipotrópica da toxina. Êle chama atenção para a particularidade da destruição do retículo da membrana não depender da necrose clostridiana, mas sim da influência piogênica e da necrose isquêmica encontrada também no músculo normal, privado de circulação, ou quando se lhe suprime o oxigênio tornando-o rapidamente necrótico.

Com efeito, diz ROBB-SMITH, é difícil senão impossível, determinar a influência das atividades enzimáticas no processo gangrenoso, ou melhor, o principal enzima responsável por esta ou aquela alteração textural, embora se conheça os seus efeitos *in vitro*. Não há dúvida, acrescenta, decorrer do trabalho de CROOK que a destruição das gorduras depende dos fermentos lipolíticos encontrados nos filtrados de cultura. Mas o mecanismo da exsudação de líquidos nos espaços texturais, e a relativa pobresa de depósitos fibrinosos, permanecem obscuros, no seu entender. Podia-se pensar, ajunta ainda, derivar o exsudato em grande parte do plasma dos tecidos, o que implicaria no aumento da fibrina presente, se REED & COL. não tivessem demonstrado possuirem os filtrados de culturas de perfringens um fermento fibrinolítico, existente também no músculo das cobáias experimentalmente infectadas por esse germen. Ademais, podia-se admitir que o edema resultasse do líquido intercelular, transferido das fibras por osmose do líquido intersticial.

A persistência das miofibrilas na intoxicação pelo perfringens revela largamente que o germen não produz enzimas proteolíticos de ação sôbre a miosina. Antes de se conhecer bem, individualmente, o efeito dos fermentos existentes nos filtrados sôbre os tecidos, fica difícil saber os efeitos locais e gerais da infecção.

O mecanismo de formação das bôlhas cutâneas foi examinado por WEINBERG & COL. que observaram alterações na substância colágena, encarregada de fixar a epiderme na camada de Malpighi às custas de uma rica

rede de fibrilas dessa substância, a qual se degrada pelo efeito do calor e dos álcalis. Mas ROBB-SMITH não acredita que seja exatamente êste o mecanismo da formação das bôlhas cutâneas, porque nestas há disjunção derma-epiderme.

Fator significativo na dissociação textural na gangrena gasosa parece ser a hialuronidase que favorece, antecipando, a expansão da péle, na alteração exercida sobre o colágeno, como querem CHAIN & DUTHIE.

Os efeitos da toxina pura sôbre os tecidos não aparecem quando esta é neutralizada. Por isso, o emprêgo local da antitoxina, como propuzeram BULLOCH & CRAMER em 1919, previne a gangrena, e o seu emprêgo tem indicação principalmente quando os ferimentos são profundos na massa muscular.

STONER & GREEN, segundo ROBB-SMITH, atribuem as alterações gerais observadas na gangrena gasosa à carência de trifosfato de adenosina, encontrada por êles nos tecidos, mas BOLLMANN & FLOCK objetam que o choque não aparece, a menos que a circulação do órgão tenha-se interrompido por mais de 3 horas, tempo suficiente para a regeneração da adenosina.

A incapacidade dos germens por si mesmos de promoverem o processo gangrenoso, já era prevista pelo que se sabia do tétano e do botulismo. Todos êstes clostrídios podem ser incluídos num grupo único de clostrídios toxígenos, ao qual devem a característica de produzir doença sempre causada pelas toxinas.

Do botulismo já se sabia que a inoculação subcutânea do germen era perfeitamente tolerada e inócua. Resultou que as alterações observadas são do tipo da intoxicação pura e como o germen está ligado aos alimentos ficou a doença provocada por sua toxina como uma intoxicação alimentar pura.

Pouco diferente é o que se observa com o tetáno, o clostrídio tetânico não se multiplicando no organismo, senão em condições especialíssimas e análogas áquelas que facultam a infecção gangrenosa. Ha mais de 50 anos VAILLARD & ROUGET verificaram que a introdução do *Cl. tetani* debaixo da péle era inoperante para a produção do tétano, sendo os germens logo prêsa dos fagócitos e consequentemente destruidos dentro de 2 ou 3 dias, exatamente como sucede com os clostrídios da gangrena, vimos acima. Não é de admirar que tal suceda. Realmente esses germens não são parasitos, tendo seu *habitat* na natureza onde exercem funções degradativas sôbre a matéria orgânica, principalmente proteolíticos. Incidentemente êles, ou suas toxinas (no caso do botulismo), penetram no organismo. Se as condições são favoráveis eles alí proliferam e mesmo em pequena escala promovem grandes distúrbios, produtores que são de toxinas altamente potentes.

Acentua FRASER que a gangrena gasosa se distingue das outras infecções justamente pela rapidez de sua evolução levando muitas vezes a um éxito fatal.

Realmente, parece que a bacilemia não é fator predominante na gangrena porque em mais de mil casos ZEISSLER & RASSFELD não encontraram germens da gangrena no sangue circulante em mais de 1/3 dos doentes. BENZONI acentua uma evolução excessivamente rápida de horas nalguns casos, fazendo pensar antes num envenenamento.

A Gangrena Gasosa como Doença Neurotóxica

Meditando nos sintomas da intoxicação gangrènosa, na qual os sinais de intoxicação nervosa são evidentes, e nas analogias da doença provocada por alguns dêles, como o *Cl. tetani* e *Cl. butulinum*, imaginamos que a toxina gangrenosa, e por consequencia a doença provocada por ela, fosse, como aquelas, doença neurotóxica.

Com Rita Almeida Cardoso e Araujo Costa conseguimos demonstrar a existência de lesões no sistema nervoso, em animais intoxicados em curto tempo ou prolongando a intoxicação.

Na intoxicação rápida, ocorrida dentro de 20 a 30 minutos, por via venosa, apareceram graves alterações nas células da medula, mòrmente nas grandes células motoras das pontas anteriores, e também nalgumas das células das pontas posteriores e do bulbo raqueano, alterações não encontradas em animais testemunhas sacrificadas em plena saude. As alterações constavam de cromatólise no corpo celular, picnose do núcleo, sendo conservada a bainha de mielina. As lesões eram mais acentuadas com a toxina do *Cl. histolyticum* e do *Cl. perfringens* — Figs. 1 a 3.

Promovendo intoxicação prolongada, mediante doses subletais e repetidas, observamos lesões no sistema nervoso central, constituidas por hiperemia, e em certas regiões, hemorragias perivasculares nas substâncias branca e cinzenta, em tôrno dos vasos, edema e acúmulo de células gliais, com aumento e hipercromatose nucleares. Do mesmo passo havia descoramento

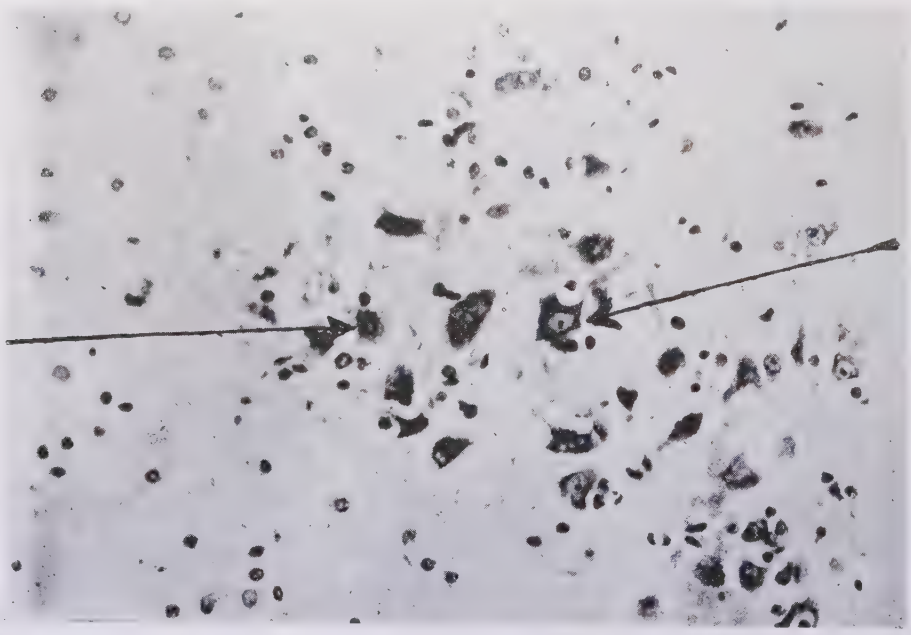


Fig. 1 — *Corte da medula espinhal de camundongo. Liquefação e destruição das celulas nervosas. Toxina do* Cl. septicum.

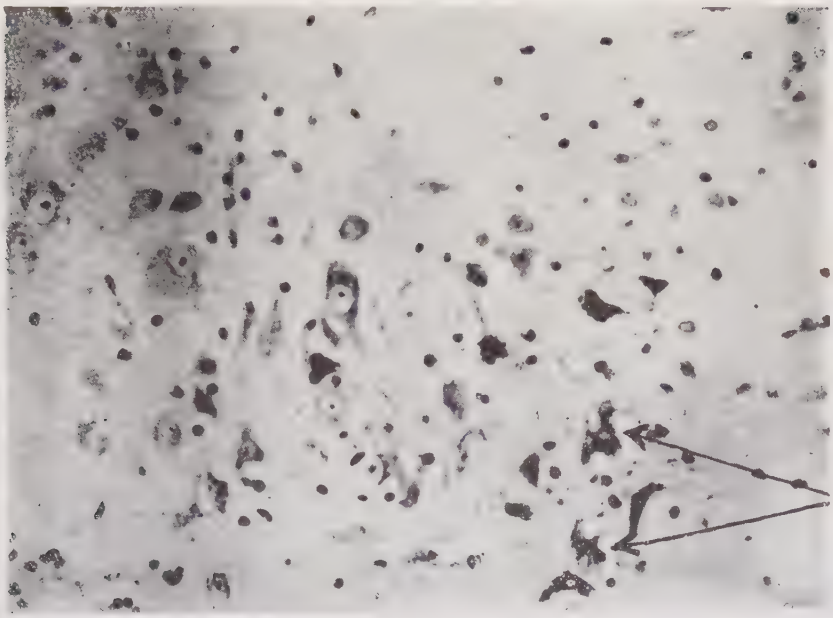


Fig. 2 — *Medula espinhal de camundongo. Tumefação aguda, liquefação, sombras celulares. Toxina* Cl. perfringens.

Fig. 3 — *Medula espinhal de camundongo. Segmento de células satélites* (a), *pequeno foco de edema na substância branca* (b). *Toxina* Cl. perfringens.

ou fragmentação da bainha de mielina e deformações baloneformes. Alterações morfológicas foram vistas também no corpo celular nas mais diferentes regiões do sistema nervoso : cérebro, protùberância, bulbo e na medula espinhal. Essas alterações encontravam-se nas zonas edemaciadas ou hemorrágicas e pertenciam de ordinário ao tipo agudo de SPIELMEYER, isto é, entumecimento agudo e liquefação celular. De outras vezes as alterações constavam de aglutinação das granulações de NISSL, os prolongamentos dentríticos apresentavam aspecto sinuoso, e viam-se células do tipo das "células encarquilhadas" de SPIELMEYER. Frequentes também eram as sombras celulares envolvidas por células satélites em fase de neurofagia.

Em suma foram vistos:

1) entumecimento agudo e liquefação das células nervosas nas regiões examinadas.

2) Encarquilhamento de células isoladas.

3) Reação glial de neuronofagia.

4) Desmielinização.

5) Edema.

6) Hiperemia, hemorragias punctiformes e fócos apopléticos.

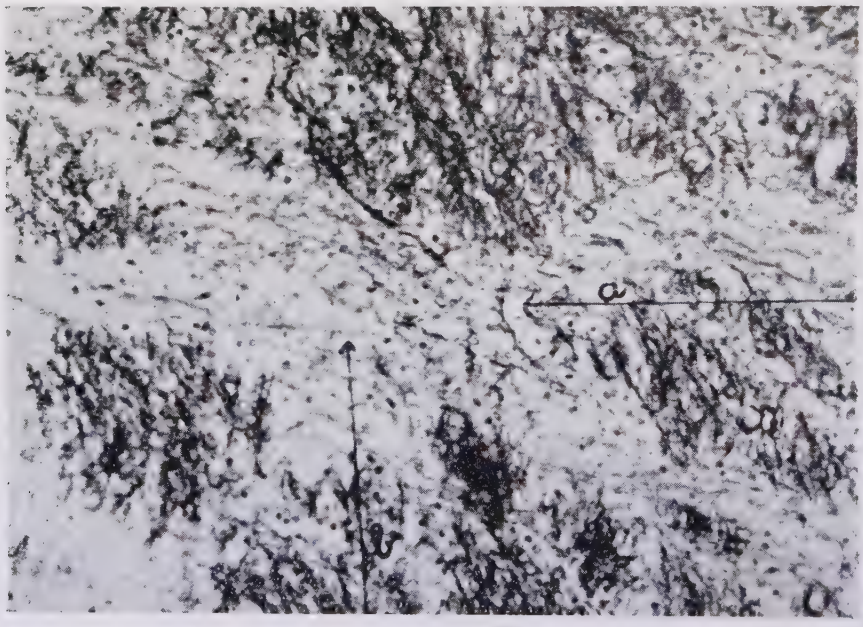


Fig. 4 — *Cérebro de cão. Dissociação das fibras de mielina* (a), *que aparecem fragmentadas* (b). *Toxina do* Cl. perfringens.

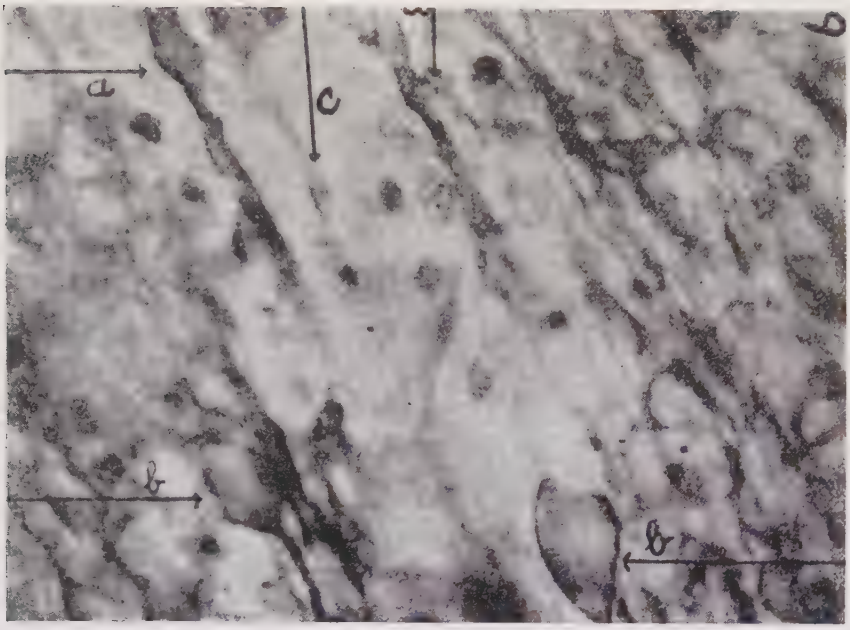


Fig. 5 — *Cérebro de cão. Deformação da bainha de mielina* (a), *células em balão* (b), *fragmentação da fibra nervosa.*

Fig. 6 — *Bulbo raqueano de cão. Células do núcleo da substância reticulada com emtumecimento agudo* (a), *inicio de encarquilhamento* (b), *sombras celulares* (c).

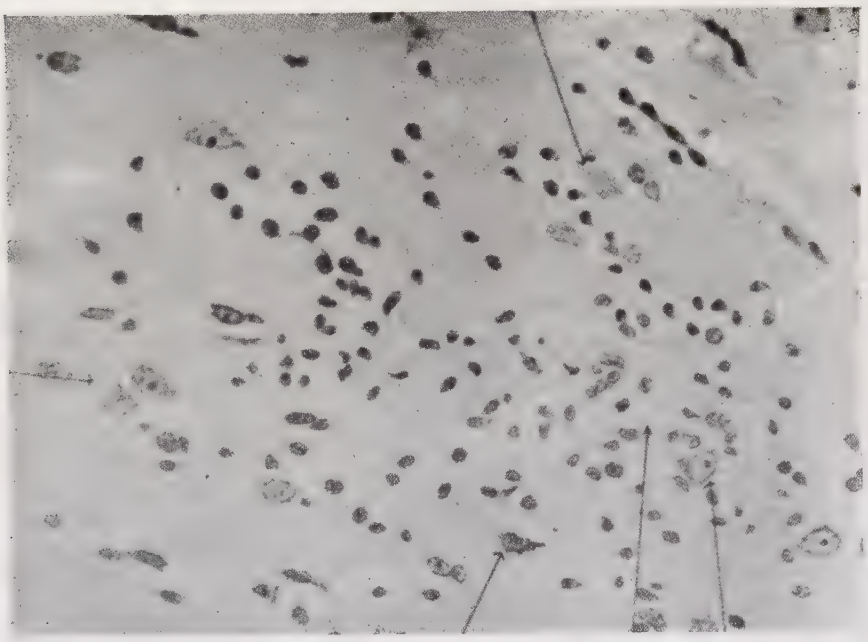


Fig. 7 — *Cérebro de cão. Edema perivascular próximo a um vaso sanguineo, tumefação e liquefação de células nervosas.*

As alterações acima tanto se observaram na intoxicação rápida quanto nas prolongadas, e foram realizadas em camundongos e em cães intoxicados artificialmente.

Estabelecida a existência de lesões somáticas do tecido nervoso na intoxicação gangrenosa, caberia verificar se eram estas acompanhadas de perturbações funcionais. Para isso nos valemos, com ARAUJO COSTA, MOUSSATCHÉ e THIAGO DE MELLO, do método de OZORIO DE ALMEIDA e colaboradores, na chamada "preparação de medula isolada trem posterior", que tem servido, na asserção do pranteado fisiologista patrício, para medir a atividade funcional do sistema nervoso, contando-se o tempo de duração dos reflexos espinhais na pata pinçada. Os animais intoxicados préviamente apresentavam reflexos retardados, em comparação com as testemunhas. Determinaram então as toxinas gangrenosas encurtamento daquele tempo, revelando alterações funcionais das fibras nervosas da raque.

Finalmente medimos, com THIAGO DE MELLO E ARAUJO COSTA, a atividade dehidrogenásica do cérebro de camundongos ajuntando à toxina do *Cl. histolyticum*, pela técnica de THUNBERG. Observamos uma dilatação no tempo da atividade redutora do azul de metileno com os cérebros de camun-

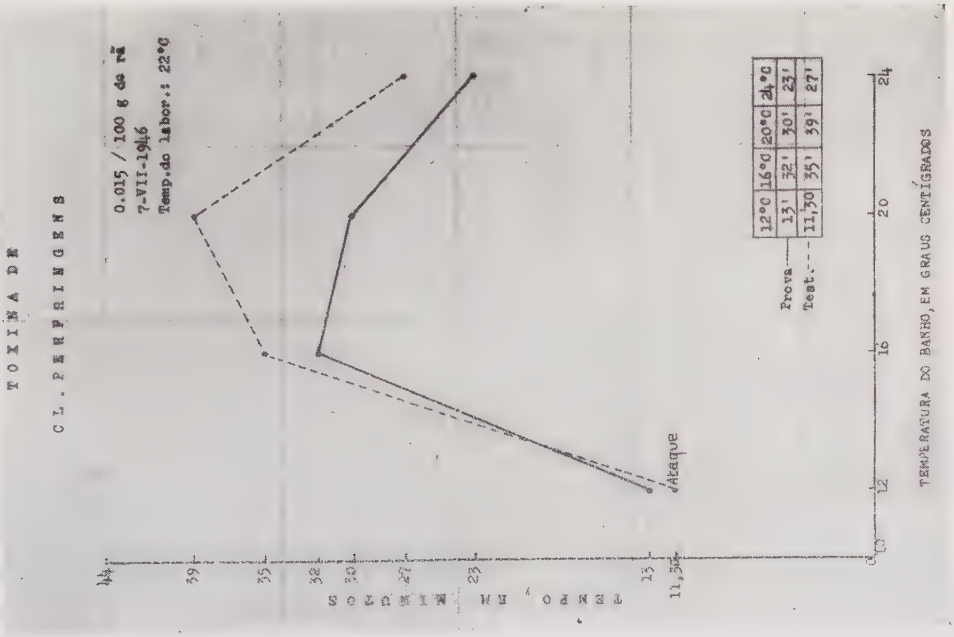

TOXINA DE
CL. PERFRINGENS
0.015 / 100 g de rã
7-VII-1946
Temp.do labor.: 22°C
Ataque
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
Prova
Test.
12°C 16°C 20°C 24°C
13' 32' 30' 23'
11,30 35' 39' 27'

Fig. 9

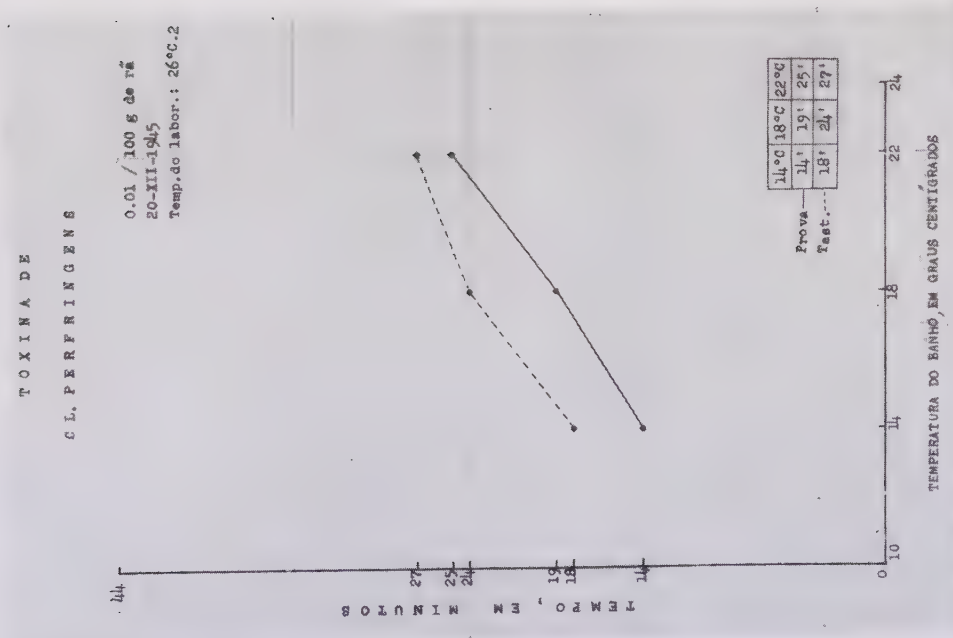

TOXINA DE
CL. PERFRINGENS
0.01 / 100 g de rã
20-XII-1945
Temp.do labor.: 26°C.2
TEMPO, EM MINUTOS
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
Prova
Test.
14°C 18°C 22°C
14' 19' 25'
18' 24' 27'

Fig. 8

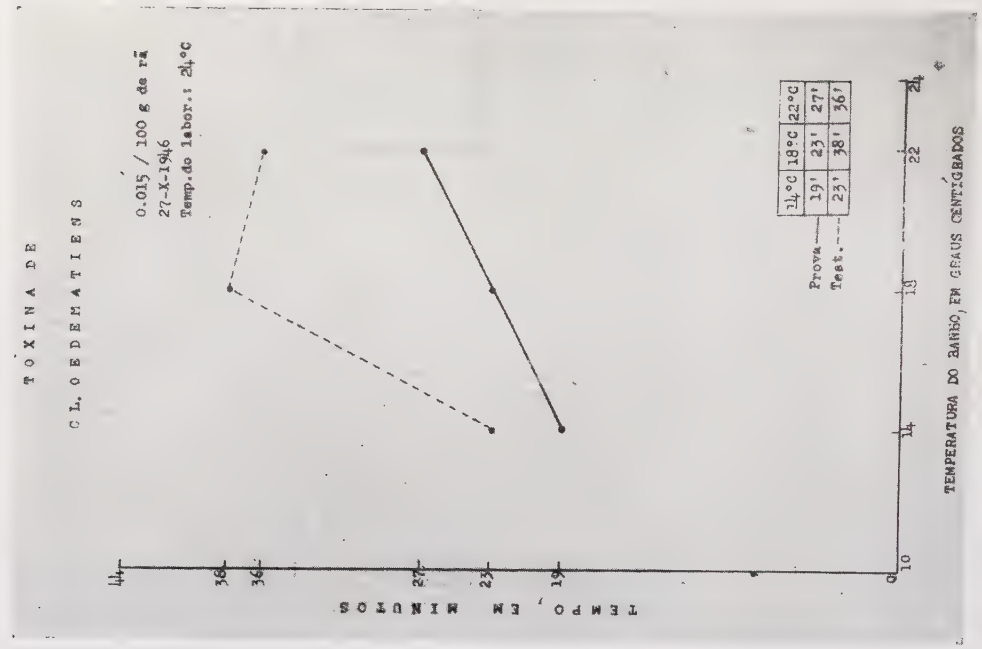

TOXINA DE
CL. OEDEMATIENS
0.015 / 100 g de rã
27-X-1946
Temp.do labor.: 24.°C
TEMPO, EM MINUTOS
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
14°C 18°C 22°C
Prova 19' 23' 27'
Test. 23' 38' 36'

Fig. 11

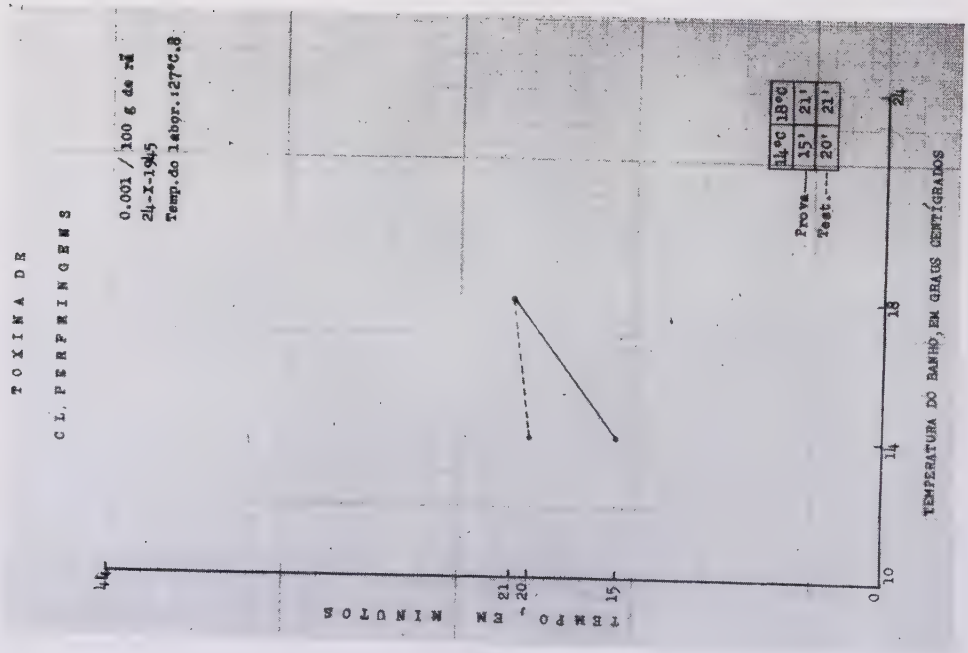

TOXINA DE
CL. PERFRINGENS
0.001 / 100 g de rã
24-X-1945
Temp.do labor.:27°C.8
TEMPO, EM MINUTOS
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
14°C 18°C
Prova 15' 21'
Test. 20' 21'

Fig. 10

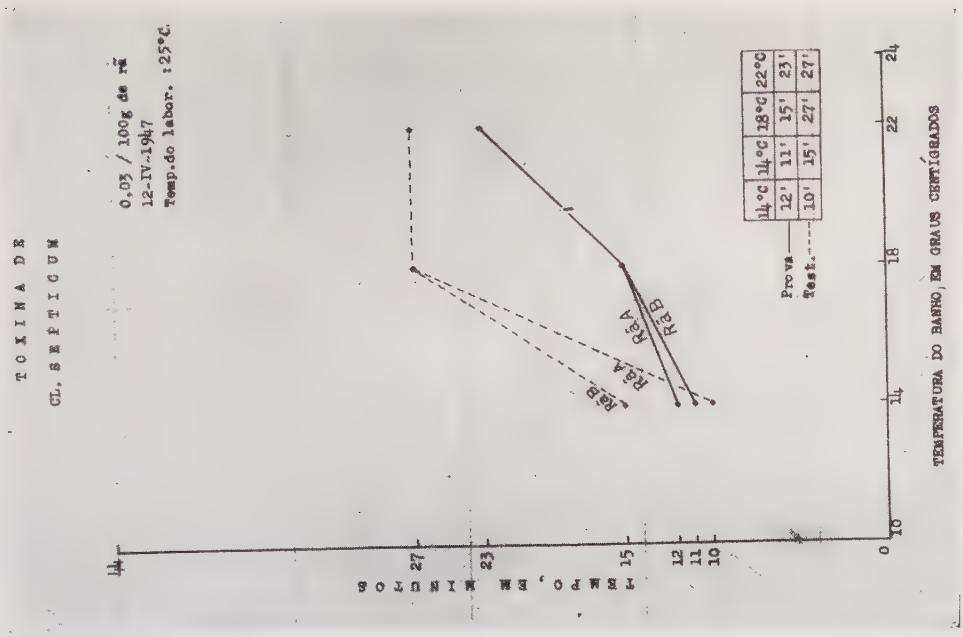

TOXINA DE
CL. SEPTICUM
0,03 / 100g de rã
12-IV-1947
Temp.do labor. :25°C.
TEMPO, EM MINUTOS
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
Prova
Test.
14°C 14°C 18°C 22°C
12' 11' 15' 23'
10' 15' 27' 27'

Fig. 13

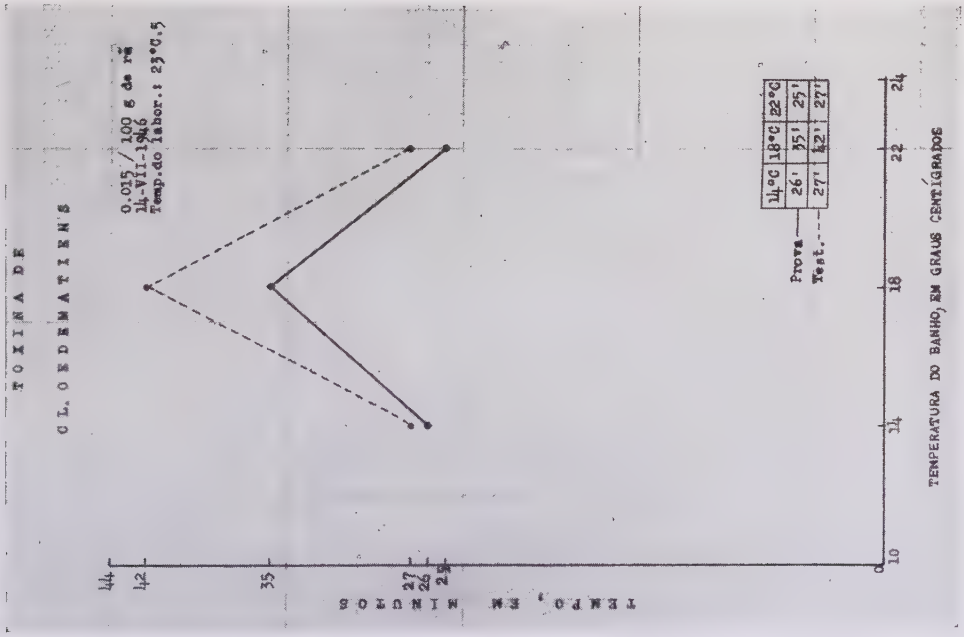

TOXINA DE
CL. OEDEMATIENS
0,015 / 100 g de rã
14-VII-1946
Temp.do labor.: 23°C.5
TEMPO, EM MINUTOS
TEMPERATURA DO BANHO, EM GRAUS CENTÍGRADOS
Prova
Test.
14°C 18°C 22°C
26' 35' 25'
27' 42' 27'

Fig. 12

dongos, após uma hora de contacto com a toxina, em comparação com os cérebros de animais normais. As determinações do descoramento feitas logo após a junção das toxinas não foram estatisticamente significativas. Resultados análogos foram observados usando cérebro de animais préviamente intoxicados, com uma hora ou mais, acentuando-se a demora do descoramento com o tempo de intoxicação e se mostraram estatìsticamente significativas.

TABELA I

Intoxicação "in vitro". Tempo de descoramento do azul de metileno pelo extrato aquoso de cérebro de camundongos normais, na presença e na ausência de toxina do *Clostridium histolyticum*

Mistura dos reagentes	Toxina (mg)	N.º	Tempo de descoramento (segundos)		
			Média	Limites	Desvio padrão
Imediata	0.0	20	422	270–570	± 74.5
	1.0	20	401	300–540	± 62.2
	0.0	20	431	255–615	± 92.7
Depois de 1 hora	1.0	19	525	420–660	± 68.5

TABELA II

Intoxicação "in vitro". Tempo de descoramento do azul de metileno pelo extrato aquoso de cérebro de camundongos normais e intoxicados durante 1, 2 e 3 horas com 0.1 mg de toxina de *Clostridium histolyticum*

Camundongos	N.º	Tempo de descoramento (segundos)		
		Média	Limites	Desvio padrão
Normais	19	412	315–510	± 49
Intoxicados:				
1 hora	20	364	300–465	± 43
2 horas	20	435	330–495	± 40
3 horas	22	429	345–540	± 56

De passagem podemos assinalar que observamos aparecimento de paralisia nos camundongos intoxicados, na fase final da intoxicação, vista na fotografia n. 14.

Nos animais intoxicados aparecia em curto tempo, dentro de uma hora da introdução da toxina, uma hiperemia das meninges com formação de fócos hemorrágicos, sob aparência de manchas vermelhas ao longo da sutura mediana, visíveis pela transparência da calota craneana.

(Fig. 14) (1)

Resultam das experiências que a fibra nervosa sofre na sua integridade, perdendo atividade condutora de influxo nervoso e na atividade respiratória. Essas alterações se instalam em curto tempo, provavelmente antes que lesões locais se tenham desenvolvido notavelmente, como que precedendo-as.

As presentes verificações deslocam o centro de atividade das toxinas gangrenosas para o sistema nervoso central e justificam a creação de uma *teoria neurotóxica* para a gangrena gasosa que estabelecemos anteriormente.

Realmente, as lesões texturais dos músculos e tecidos adjacentes, não explicariam a morte rápida observada na maioria dos casos de gangrena gasosa, tampouco o seu súbito agravamento, que em horas pode ameaçar a vida do paciente.

Com efeito, o desequilíbrio nervoso reflete-se no equilíbrio orgânico e arrasta consigo o agravamento de qualquer mal.

De outro lado, os demais clostrídios anaeróbios-tetânico e botulínico, provocam intoxicações exclusivamente nervosas, isto é, são doenças essencialmente neurotóxicas. As analogias existentes entre esses dois germens e os da gangrena gasosa, foram de molde a grupá-los no gênero *Clostridium*.

Entre êles haveria diferenças com relação a influência sôbre o sistema nervoso, podendo-se agora aproximá-los todos três, nêste particular, como produtores de toxinas neurotóxicas.

(1) As ilustrações foram retiradas dos trabalhos referidos no texto.

As nossas verificações parece-nos que não têm sómente esse mérito, mas ainda uma aplicação na clínica, orientando o prático na vigilância e assistência ao sistema nervoso central, o grande controlador do equilíbrio orgânico, inclusive das defezas naturais do organismo nos casos de gangrena gasosa. Tudo está em saber como acudir a êsse sistema, mas não resta dúvida que deve ser cuidado.

De outro lado, as alterações nervosas explicariam muitos sintomas da gangrena gasosa correlacionadas ao sistema nervoso, bem como a morte rápida em curto tempo que só uma debacle desse sistema pode explicar.

BIBLIOGRAFIA

Baker, A. B.
1943. Am. J. Path. **19**:709.

Bennet, H. W.
1932. Vet. J. **88**:248.

Bulloch, W. E. & Cramer W.
1949. Proceed. Roy. Soc. **90**:513.

Buttle, G. A. H. & Brevan, G. W. Apud Robertson
1929. System of bact. 3: Cap. IX.

Callender & Col., *apud* Favata & Col.

Campbell, J. A.
1931. Phys. Rev. **1**.1.

Chevalier & Creers
1909. C.R.S. Biol. **66**.

Clook, R. O.
1938. Surg. Gyn. Obst. **66**:878.

Combiesco, D.
1928. An. Inst. Past. **38**:855,

Ellinger — Apud Fraser.

Elischer, J.
1876. Wirch. Arch. **66**, 64.

Favata, B. V., Dowdy, A. H., Sewell, R. L. & Vincent, J. G.
1944. Surg. Gyn. Obst. **79**:660.

Fildes, P.
1929. Brit. J. Exp. Path. **8**:387.

Fraenkel, E.
1899. Münch Med. W. p. 1.420 e 1.371.

Fraenkel, E.
1902. Zeit. f. Hyg. **40**:99.

Fraser, J.
1919. Med. R. — Counc., sp. Rep. Ser. **39** : 6.

Frei, W.
1936. Erg Allg Path. und. Path. Anat. **31**:123.

Friedman, W. & Elkeles, A.
1934. Lancet **1**:718 e 775.

Henry H. & Lacey, M.
1920. J. Path. Bact. **23**:273.

Henrys Roberts E. & Cowell, C. M.
1916. J. Path. Bact. **21**:473.

von Hibler, E.
1908. . Untersuchungen über die Pathogenen Anaeroben, Jena.

Holder, H. G. & Mackay, E. M.
1924. Milit. Surg. **90**:509.

Hall Ivan C.
1918. J. Bact. 1928: **15.**

Kahn, M. C.
1924. J. Med. Res. **43**, 155, 1924; J. Inf. Dis. **35**:423.

Kelaway, C. H., Trethwie, E. R. & Turner, A. W.
1940. Austr. J. Exp. a. Med. Science, **8**:253.

Kettle, E. H.
1919. R. p. Med. Res. **39**:173.

Kitasato, O.
1890. Zeit. f. Hyg. **8** e **55.**

Klein, E.
1895. Cent. fuer Bakt. **15** : 276, 598, 756, e 1894, **18**: 105; 636; 737.

Kendall A. & Schmidt, E.
1926. Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. **24**:104.

Kroop B. & Smith G. D.
1941. War Medicine **1**: 682.

Lautenschläger A.
1928. Arch. F. Exp. Path.

Mac Farlane R. G. & Mac Lennan, J. D.
1945. Lancet **149**:239.

McNee, J. & Dunn, J. S.
1917. Brit. Med. J. **1**: 789.

Ozorio de Almeida M., Moussatché H., Vianna Dias, M.
1938. Livro Jubilar do Prof. Lauro Travassos, p. 359.

Ozorio de Almeida, M. Moussatché, H. Vianna Dias, M.
1914. Rev. Bras. de Biol. Pag. **195**, **165** e **293**.

Ozorio de Almeida, A. & Pacheco, G.
1941. Rev. Bras. Biol **1** (1):1.

Pacheco, G. Thiago de Mello. M.
1950. Apresentado ao 5.º Congresso Int. Microb. Em impressão.

Pacheco, G. Araujo Costa, G.
1947. Rev. Bras. Med. **4**: 13.

Pacheco G. & Moussatché, I. Costa, G. A. & Thiago de Mello M.
1947. Mem. Inst. Osw. Cruz, **45** (3): 609.

Pacheco G., Cardoso, R. A. & Costa, G. A.
1947. Brasil Med. 59:375, 1945 e Mem. Inst. Osw. Cruz,**45**:881.

Pacheco, G. & Costa, G. A.
1941. Rev. Bras. Biol. **1**:145.

Pacheco, G. & Costa, G. A.
1940. O "Hospital", **17**, n. 3.

Pasternack J. G. & Bengston, I.
1937. Nat. Inst. of. Health. Bull. n. **168**.

Reed, G. B., Ohrr, J. H. & Brown H. J.
1943. Bact. **45**:475.

Robb-Smith, A. H. T.
1945. Lancet **249**:362.

Sacquepée, E.
1915. Press. Med. **23**:113.

Spadafine, L.
1923. Patologica **24**:597.

Straub, W.
1919. Müunch. Med. Woch. **66**: 89.

Taylor — *apud* Enrys — Robert & Cowell

Valdeyer
1906. Arc.h f. Path. Anat. und. Phys. **34**:473.

Vailard, L. & Rouget, J.
189.2 An. Inst. Past. **16**:385.

Weinberg, M., Nativille, R. & Prevôt. A. R.
1937. Les Microbes Anaerobes, Paris.

Wright & Fleming
1924. Bull. War Med. II : 251.

Zeissler J.,
1930. in Kolle & Wassermann Handb. der Path. Mikroorg. 3.i Ed. vol. **10**.

Zeissler, J. & Rassfeld, L.
1929. Cent. f. Bakt. **100**:24.

SUMMARY

Since von Hibler gas gangrene has been considered a local infection with systemic symptoms. When we consider some of the symptoms of gas gangrene, those of the central nervous system are in evidence beeing similar to those observed in tetanus and botulism. It is likely therefore that gas gangrene intoxication and the disease caused by it are of neurotoxic nature.

With Almeida Cardoso and Araujo Costa we were able to demonstrate lesions in the central nervous system of animals wich had been intoxicated during a short period of time as well as in those with intoxication of longer duration. In acute intoxication, after intracreneal inoculation, severe alterations were seen within 20 to 30 minutes in the cells of the spinal cord, specially in motor cells and also in some cells of the posterior cord and spinal bulb. The changes consisted in chromatolysis and picnosis and were more marked in animals intoxicated with *Clostridium histolyticum* and *Cl. perfringens* toxines. Myelin sheet was unchanged.

In delayed intoxication with greater and repeated dosis lesions of the central nervous system (brain, protuberance, medula ablongate and medula spinal) were observed. They consisted in hyperemia, perivascular hemorrages in white and grey substances, oedema, accumulation of glia cells with enlarged and hyperchromatic nuclei, fragmentation of the myelin sheet and balooning degeneration of the described by Spielmeyer. Such changes were found in the swollen and hemorragic zones and were generally similar to those found in the acute type of Spielmeyer (acute swelling and liquefation). Other changes found sometimes were agglutination of Nissl's bodies, sinuous appearence of the dendritic endings, shruncken cells of Spielmeyer and neuronophagy around "ghost" cells.

In short the changes found were :

1) acute swelling and liquefation of ganglion cells;
2) shrinkage of isolated cells ;
3) glial reaction (neuronophagy);
4) desmyelinization;
5) oedema;
6) hyperemia, punctiforme hemorrages and apoplexy.

(Figs. 1-7)

These alterations were seen in both short and prolonged intoxications (repeated sub-lethal dosis of toxine).

In order to verify the existence of physiological troubles in consequence of the intoxication of central nervous system we employed with Araujo Costa, Moussatché and Thiago de Mello, the method of Ozorio de Almeida and coworkers, the so called "preparation of isolated spinal cord of frog" proposed for the mesurement of the functional activity of the central nervous system. Animals which had been previously intoxicated showed lowered spinal reflexes in comparison with the controls. This observation evidence that gas gangrene intoxication could reduce the nervous activity revealing functional alterations in the nervous fibres of the spinal cord (Figs. 4, 5, 6).

Furthermore to demonstrate the deficience of nervous activity we measured, with Thiago de Mello & Araujo Costa the dehydrogenase activity of brains of mice, adding the toxine of *Cl. histolyticum* to the nervous tissue. Using Thunberg's technic we observed a delay of the reduction of methylene blue with the brains of mice when the tissues had been in contact with the toxin during one hour, in comparison with the brains of normal animals. The delay in reduction observed as soon as the tissue came in contact with the toxin was not statistically significant. When we used the brains of animals previously intoxicated after one hour or more, the reduction was delayed and this delay was statistically significant (Tables 8-13).

In the final stage of the intoxication paralysis was observed in intoxicated mice (Fig. 14).

The experiments demonstrated that nervous fibres suffered in their integrity and loose their physiologic activity of conduction of the nervous influx; these alterations were noted within a short period of time, probably before significant lesions had developed.

The above results suggest that the center of activity of gas gangrene toxins is the central nervous system and justify the neurotoxic theory for gas gangrene which we proposed previously.

In fact, the actual lesions of the muscles and adjacent tissues do not explain the rapid death observed in most cases of gas gangrene nor the sudden appearence of distressing symptoms.

The etiologic agents of tetanus, botulism and gas gangrene belong to the genus *Clostridium*. The presence of central nervous system alterations and the symptoms in gas gangrene are another feature in common with tetanus and botulism.

As a result of our research practioners must pay more attention to the nervous symptoms that probably explain the death sometimes observed in that diseare.

Contribuição ao Estudo da Fito-Imunidade

NOTA PRÉVIA

por

R. J. de Siqueira-Jaccoud (*)

Alvaro Emery Trindade (**)

Os autores estudaram as propriedades precipitantes dos extratos de fôlhas de diversos exemplares pertencendo, principalmente, às espécies *Crotalaria striata* DC (vegetal herbáceo que, no caso tinha em média 1 metro de altura) e *Clitoria racemosa* Benth. (arbóreo cujos exemplares usados tinham em média de 2,5 metros) contra antígeno heterólogo.

Todos os exemplares estudados foram testados para verificar a presença de precipitinas normais contra os antigenos que, posteriormente, foram inoculados nos caules.

Antígenos: Inicialmente foi escolhida a albumina de ôvo a 50% em água distilada, que se revelou um ótimo antígeno para o estudo em curso, razão pela qual ainda é por êles utilizada. Depois passaram a usar concomitantemente a anatoxina diftérica, que por razão de ordem prática foi substituída pela toxina diftérica.

Técnica de inoculações. A técnica de inoculação consistiu em injetar certa quantidade de antígeno nos vasos condutores do vegetal por intermédio de orifício, mais ou menos profundo, aberto no caule.

Técnica de reação. A reação para a demonstração de precipitinas foi realizada em tubos de *Uhlenhuth*, utilizando os autores a toxina diftérica pura e a albumina de ôvo a 50% em água fisiológica, e extrato de folhas feito por trituração em gral com água fisiológica, respeitando a relação decigrama-mililitro. Êste extrato foi centrifugado e diluido antes de entrar em contacto com os antígenos, sendo a leitura dos aneis precipitantes feita sempre após uma hora à temperatura ambiente.

Resultados obtidos. Usando a reação acima mencionada, os autores evidenciaram a presença de precipitinas nos extratos de fôlhas dos vegetais inoculados, na proporção de 2 a 20 vêzes superior aos valores normais.

Observaram também que esta *imunidade* se distribui de modo diferente, nos vasos condutores. O aumento destas precipitinas atinge o máximo nos

(*) Do laboratório do Hôrto de Plantas Medicinais.

(**) Do laboratório de Imunologia.

primeiros dias, caíndo em seguida lentamente. Os autores comprovaram o fato já conhecido de ser a imunidade nos vegetais pouco duradoura.

Também pode ser observado que inoculações repetidas num mesmo exemplar dão reações positivas em maiores diluições do extrato.

Desta forma o aumento do teor de precipitinas nestes vegetais, nas condições aquí referidas, parece aos autores correr por conta de uma *imunidade adquirida*.

A finalidade da presente nota é revelar uma parte dos estudos que os autores vêm realizando e propor a consideração dos fenômenos aquí descritos como sendo de *fito-imunidade adquirida*.

Todavia os autores continuam os trabalhos na coleta de novos dados que possibilitem uma ideia completa sôbre êste importante capítulo da Imunidade.

UEBERSETZUNG

Beitrag zum Studium der Pflanzenimmunitaet

(VORLAEUFIGE MITTEILUNG)

Die Verfasser studierten die praezipitierenden Eigenschaften der Blattextrakte verschiedener Exemplare, hauptsaechlich der Arten:

Crotalaria striata DC (ein Krautgewaechs, das im bearbeiteten Falle 1 m mittlere Hoehe besass) und *Clitoria racemosa* Benth (ein Baumgewaechs, dessen Exemplare im vorliegenden Falle 2,5 m mittlere Hoehe bessassen) gegen heterologes Antigen.

Alle bearbeiteten Exemplare wurden auf die Gegenwart von normalen Praezipitinen gegen Antigene geprueft, die spaeter in Stengel und Staemme inokuliert wurden.

Antigene: Anfaenglich wurde Huehnereiweiss in 50%iger Loesung in destilliertem Wasser ausgewaehlt, das sich als bestes Antigen fuer die laufenden Studien erwies, weswegen es von den Autoren laufend verwendet wurde. Spaeter gingen sie dazu ueber, gleichzeitig Diphterie-Anatoxin zu verwenden, das aus praktischen Gruenden durch Diphterie-Toxin ersetzt wurde.

Inokulations-technik: Die Inokulationstechnik bestand in Injektion einer gewissen Menge von Antigen in die Leitungsbahnen der Pflanzen vermittels einer mehr oder weniger tiefen Bohrung im Stamm.

Technik der Reaktion: Die Reaktionen zur Demonstration der Praezipitine wurden in Roehrchen nach *Uhlenhuth* durchgefuehrt, indem die Verfasser das Diphterie Toxin in reiner Form und die 50%ige Loesung von Albumin in physiologischer Loesung, sowie den durch Zerreiben in physiologischer Loesung gewonnenen Blattextrakt verwendeten, wobei die Relation Dezi-

(*) Aus dem Laboratorium des Gartens fuer medizinale Pflanzen.
(**) Aus dem Laboratorium fuer Immunologie.

gramm/Milliliter beachtet wurde. Vor dem Eintritt des Kontaktes mit den Antigenen wurde dieser Extrakt centrifugiert und verduennt; die Ablesung der praezipitierten Ringe wurde immer eine Stunde spaeter bei Umgebungstemperatur durchgefuehrt.

Erhaltene Resultate: Bei Anwendung der oben genannten Reaktion zeigte es sich, dass die Blattextrakte von inokulierten Pflanzen Praezipitine enthalten, die 2 bis 20 mal hoeher als die normalen Werte liegen.

Die Autoren beobachteten ebenfalls, dass diese *Immunitaet* in Abhaengigkeit von den Leitungsbahnen sich unterschiedlich in den Zweigen verteilt, die oberhald des Inokulationspunktes gelegen sind. Die Zunahme der Praezipitine erreicht ihr Maximum in den ersten Tagen und nimmt im folgenden langsam ab. Sie wiesen die bereits bekannte Tatsache nach, dass die Immunitaet in Pflanzen nur von geringer Dauer ist.

Es konnte ebenfalls nachgewiessen werden, dass sich nach wiederholten Inokulationen desselben Exemplars positive Reaktionen in staerkeren Verduennungen des Extraktes ergaben.

Hierdurch glauben die Autoren annehmen zu koennen, dass der erhoehte Gehalt an Praezipitinen in diesen Pflanzen unter den vorliegenden Verhaeltnissen durch eine *erworbene Immunitaet* verursacht wird.

Der Zweck der vorliegenden Niederschrift ist, einen Teil der Untersuchungen, die die Autoren zur Zeit durchfuehren, mitzuteilen und die hier beschriebenen Erscheinungen als *erworbene Phytoimmunitaet* zu betrachten,

Inzwischen werden die Studien zur Gewinnung neuer Daten fortgefuehrt, die eine vollstaendigere Vorstellung ueber dieses bedeutende Kapitel der Immunitat zulassen.

O Aparelho Saltatório do Halticíneo Homophoeta sexnotata Har. (Coleoptera)

por

Rudolf Barth

(Com 6 figuras)

O Prof. Dr. A. da Costa Lima chamou a nossa atenção para a formação especializada existente no fêmur dos Halticíneos sugerindo fosse feito um estudo para esclarecer as estrutura e função da mesma. Tendo à disposição bastante material fixado foi escolhida a espécie *Homophoeta sexnotata* para o estudo pois, esta oferece a grande vantagem de não ter a cutícula do fêmur pigmentada mas sim, bem transparente de modo que se pode notar o aparelho mencionado, a olho nú. O material foi capturado no Parque Nacional do Itatiaia e aproveito a oportunidade para agradecer ao seu administrador, o Dr. Wanderbilt Duarte de Barros, a gentileza de permitir a feitura de observações e coleta do material.

Os métodos usados foram os usuais da microanatomia e da histologia : colorações por hematoxilinas e vermelho congo, preparações totais das pernas com coloração por vermelho congo e clarificação por terpinol ou pelo método de Spalteholz. Algumas pernas foram tratadas por hidróxido de potássio, para a destruição da musculatura e, para o isolamento dos tendões (sôbre as técnicas, veja Barth, 1953).

Na literatura encontra-se um trabalho de Maulik (1929) sôbre o aparelho saltatório do Halticíneos. O autor constatou a presença da referida formação em algumas espécies. Examinando um número muito grande de espécies brasileiras, Costa Lima e o autor encontraram esta formação em todas elas. Maulik descreve o aparelho como sendo uma formação do endoesqueleto do fêmur considerando-a como uma dilatação de um tendão quitinizado. Quanto à sua função êle supõe se trate de um órgão saltatório ou, pelo menos, de um aparelho auxiliar para esta forma de locomoção. Êle não entra em detalhes sôbre o mecanismo e, também, não dá maior atenção à distribuição da musculatura no fêmur. Os músculos indicados nos desenhos de Maulik, sem duvida, representam apenas os tendões pois, pelo tratamento pelo KOH, usado por êle e, mencionado no começo de seu trabalho, devem ter sido destruidos todos os tecidos, inclusive os músculos.

A comunicação de Lever (1930), que localizou uma outra formação endoesquelética com aspecto de um tendão alargado, situado no ângulo interno da articulação femur-tibial, é uma continuação do trabalho de Maulik.

LEVER também não explicou a função desta formação tendo apenas feito a suposição de que ela fazia parte do aparelho saltatório.

A perna posterior apresenta, segunda êste autor, "saltatorial modifications", entretanto, não se trata de uma perna saltatória típica como a dos gafanhotos. A perna, esticada para trás, passa para além do fim do corpo apenas com a metade da tíbia e todo o tarso. Êste fato leva à presunção de que a formação especializada do fêmur serve para substituir, funcionalmente, a perna comprida e salatória do tipo ortopteróide. Na espécie tratada, o fêmur tem um comprimento de 2,7 mm e excede a tíbia de apenas 0,3 mm mas, em comparação com a tíbia, é muito aumentado e possui, no meio um diâmetro de 1,245 mm.

Abrindo-se o fêmur distendido, por meio de um corte ao longo das arestas interna e externa e, levantando-se a parede posterior do mesmo, encontra-se o aspecto representado na fig. 2. Em virtude da orientação dada ao corte não aparecem os côndilos anterior e posterior na extremidade apical que, com as duas cavidades da tíbia, constituem a articulação fêmur-tibial. Na fig. 2 a posição do ponto em tôrno do qual gira a articulação está indicada pela seta. Na extremidade da tíbia insere-se um forte tendão (SH_1), em forma de ligadura larga, correspondendo, numa perna típica de insetos, ao tendão do *musculus abductor tibiae*. Articula-se com a sua extremidade basal no órgão descrito por MAULIK. A forma dêste órgão tanto está representada na fig. 3a e b como também no corte transversal da fig. 4a. O órgão forma, quando em repouso, uma placa arqueada, com um comprimento de 1.050 μ e uma largura de 540 μ. Vista transversalmente, a placa tem um aspecto assimétrico, em forma de *S*. O lado convexo da parte maior da mesma, doravante sempre denominada *placa S*, está dirigido para trás. Do seu bordo externo (fig. 4, ex) uma parte estreita se curva para trás, do bordo interno (fig. 4, en), uma grande parte, para a frente. Esta última parte arqueada (fig. 5) diminui a sua largura em direção à extremidade distal formando, assim, o seu bordo, uma aresta oblíqua. Neste lugar insere-se um tendão comprido e largo (SH_2), considerado por MAULIK como sendo uma musculatura. Um estudo histológico da inserção de SH_2, tendo em vista a orientação das exo e endocutículas, leva, sem duvida, à conclusão de que êste corpo cuticular representa apenas uma modificação do tendão do *musculus abductor tibiae*, formando uma expansão arqueada em forma de *S*. Pode-se notar, na fig. 4b, que a endocutícula (em preto) formando a maior parte do tendão, torna-se muito fina na *placa S*, incluindo uma espessa dupla camada de exocutícula. Esta última é fortemente esclerosada e colada por uma massa colaginosa (MC). Nas arestas, dos lados externo e interno, nascem músculos denominados dilatadores (DI_{1-2}) que tem a contra-inserção nas arestas anterior e posterior do fêmur. No ângulo posterior, da parte distal da *placa S*, insere-se o terceiro dilatador (DI_3) por meio de um tendão (SH_4). Do grande tendão (SH_2) partem números fascículos musculares, divergindo em forma de ráios, para todos os lados (na fig. 2 parcialmente cortados). Todos os músculos, inserindo-se na *placa S* e nos seus tendões, representam ramos do músculo abdutor da tíbia. Pela contração dêstes músculos, a *placa S*, é deslocada para dentro do fêmur e, ao mesmo tempo, estica a tíbia. O movimento em sentido contrário é efetuado pelo *musculus flexor tibiae* (*adductor tibiae*), composto por um grupo de fascículos musculares situados ao lado da *placa* S e do músculo abdutor. O tendão (SH_2) se insere, um

pouco em sentido distal, do ponto giratório da tíbia, indicado na fig. 2 pela seta, estando incluido na membrana posterior da articulação. Êle é muito curto e longo se dilata formando uma parte de cutícula reforçada que, com a tíbia estirada e vista de trás, aparece sob forma de uma pequena peça triangular e de côr marron, sôbre a membrana articular clara. Esta placa, denominada doravante, *placa T*, corresponde ao órgão descrito por LEVER (1930). Do ponto de vista histológico esta parte representa, como foi mencionado para a *placa S*, um aumento e um reforçamento de um tendão, neste caso do tendão do *musculus flexor tibiae*. No fim desta placa, com um comprimento de quase 300 μ, o tendão se continua, com o diâmetro primitivo e entra logo em contato com os fascículos musculares. Encontra-se, na parte anterior, do lado interno do fêmur, mais um pequeno grupo de músculos cujo tendão, atravessando a tíbia e o tarso, entra no pretarso, inserindo-se no unguitractor. A contração desta musculatura abaixa as garras.

A forma da *placa T* está representada nas figs. 6a-c. A saliência encontrada na aresta posterior e distal é de grande importância para que se possa compreender o mecanismo do movimento saltatório. Tôdas as partes, *placas S e T*, cooperam, funcionando como um órgão complexo, semelhante ao que ocorre com o mecanismo saltatório dos Elateríideos que, também apresentam um órgão do mesmo tipo. Como singela homenagem ao meu bom amigo, PROF. DR. ANGELO DA COSTA LIMA, agradecido pelas suas constantes gentilezas e auxílio na classificação de muito material entomológico, dou a esta forma de órgão complexo, até agora desconhecido, o nome de *Órgão de Costa Lima*.

Dentro da cavidade formada pela *placa S* encontra-se um grupo de grandes células (fig. 4, FK) lembrando as do corpo gorduroso. Suas paredes são excepcionalmente desenvolvidas e resistentes e, no interior das mesmas, são encontradas estruturas protoplasmáticas fortes, de natureza fibrilar. Isto leva a supôr que a função das células é de qualquer forma mecânica e, talvéz, sirvam para contrôlar o estado de tensão do interior da *placa S*. Não foram encontrados nem inervação nem escolopídios.

Mecanismo do Órgão de Costa Lima

Durante o movimento saltatório a contração do músculo abdutor força a penetração da *placa S* no fêmur e, com isto, a tíbia se distende (fig. 2). Pela distensão da membrana anterior (MA_1) da articulação a extremidade proximal da tíbia também penetra na parte distal do fêmur, pois sendo ela o braço giratório menor, está situada antes do ponto de apóio dos côndilos da articulação. Ao mesmo tempo a *placa T* sai da cavidade do fêmur e se encontra agora na membrana da articulação pois, o seu tendão se insere um pouco distalmente do ponto giratório. O músculo flexor está extremamente relaxado e o músculo abdutor encurtado porém, não está mais na fase de contração ativa. Voltando a tíbia para o estado de repouso há a contração do *musculus flexor tibiae*. Agora a *placa T* entra na cavidade do fêmur. Êste movimento prossegue até a tíbia tocar o ligeiro sulco existente no lado posterior do fêmur.

Terminando êste movimento a *placa T* penetra no fêmur até que a sua aresta posterior (fig 6a, SA), já descrita acima e, que forma uma saliência acentuada, venha a se ajustar na ligeira cavidade (fig. 2, CA_1), formada

pela parede interna do fêmur. Pela flexão da tíbia a expansão anterior e distal da *placa* S é abaixada simultâneamente pois, ela está ligada à extremidade proximal da tíbia pelo tendão (SH_1). Com isto tôda a *placa S* é deslocada para baixo. Êste movimento termina no momento em que o ângulo posterior e distal da mesma se prende na segunda cavidade (fig. 2, CA_2), localizada acima daquela já mencionada. Nesta altura a contração do flexor ainda não terminou e, em consequência da contração que se continua, nasce uma tensão dentro da *placa S* pois, a sua expansão, ligada à inserção do tendão (SH_1), é abaixada ainda mais. Quando a tíbia retorna à sua posição de repouso, a *placa T* está presa na primeira cavidade e o *musculus flexor tibiae* relaxado. Dentro da *placa S* existe uma tensão que novamente tende a esticar a tíbia. Êste movimento é impedido pela *placa T*, presa na primeira cavidade. Assim, existe, durante o repouso, com a tíbia dobrada, uma tensão permanente na *placa S* mas, acontece que a *placa T* não pode sair da sua posição e, com isto, a tíbia não pode ser novamente distendida.

Logo que se julgar ameaçado, o coleóptero, para saltar, contrai o *musculus abductor tibiae*. Mas, com a contração, não haverá a distenção da tíbia pois a *placa T*, presa na cavidade, impede qualquer movimento. O efeito do trabalho muscular é a produção de um grande aumento da tensão na quitina da *placa S* pois os três dilatadores, sendo também partes do abdutor, abrem ainda mais esta placa dilatando suas arestas anterior e posterior. Para o reforçamento da curvatura da placa existe, na parte distal da mesma, uma dobra secundária (fig. 5, AS). O maior aumento da tensão na quitina da *placa S* é devido à contração das massas musculares que se inserem no grande tendão (SH_2). Pela ação dêste tendão a aresta longitudinal oblíqua (CD) da *placa S*, é puxada para o lado externo, abrindo a placa ainda mais. Tôda a tensão pode ser neutralizada pela entrada da parte proximal da tíbia no fêmur, o que levaria à distenção da mesma mas, que não se verifica em virtude da ação impediente da *placa T*. Só o tendão entre tíbia e *placa T*, é que pode ser esticado ligeiramente de modo que o forte esporão terminal e as séries de espinhos existentes no fim da tíbia, podem segurar, o insto, sôbre a folha, antes do salto.

Para anular a tensão e, com isto permitir o salto, a *placa T* deve sair da sua cavidade (CA_1). Isto se faz automàticamente no momento da contração máxima do abdutor, por intermédio da aresta oblíqua (CD) que, no estado de repouso, se encosta diretamente na *placa T*. Pelo deslocamento de CD para o lado externo resulta uma pressão para o lado da *placa T* que, sùbitamente, é forçada a sair de sua cavidade. Agora tôda a tensão acumulada na placa S e, que ainda é aumentada pela contração do abdutor, se libera. Tôda esta força considerável estica a tíbia, dando ao corpo do Halticíneo, um forte impulso: é o salto. Em seguimento ao salto, de 1 a 2 metros, o coleóptero abre as asas e começa a voar. Êste mecanismo é utilizado na aviação (catapultas) com a diferença de que a construção do coleóptero é muito mais perfeita pois êle carrega todo a aparelhagem de impulsão enquanto que, no caso dos aviões, ela permanece no solo.

A base do princípio biológico é a acumulação de uma tensão suficiente, no interior do fêmur, que permitirá desenvolver uma grande aceleração no início do movimento saltatório a fim de escapar ao inimigo. Esta fuga rápida seria impossível se o coleóptero não saltasse e tivesse que abrir lentamente as asas para, só depois, iniciar o vôo.

SUMÁRIO

Descreveu-se o mecanismo saltatório do Halticíneo *Homophoeta sexnotata*.

O aparelho se encontra localizado no fêmur e consta de uma placa cuticular arqueada, em forma de S, e, de uma placa menor, triangular. Tôdas as placas representam modificações dos tendões dos abdutor e flexor da tíbia e mantêm ainda ligação com os mesmos. Pela colaboração das duas placas acumula-se uma forte tensão no tendão do abdutor (músculo saltatório). A tíbia não se pode esticar pois a placa triangular fica presa numa cavidade da parede do fêmur. Apenas no momento da maior contração do abdutor a placa curvada força a saida da placa triangular do seu ponto de apóio. Desta maneira o forte músculo abdutor da tíbia exerce tôda a sua força, de uma só vez, sôbre a articulação da mesma, dando ao Coleóptero um forte impulso para saltar. O órgão é encontrado em grande número dos Halticíneos.

Em homenagem ao grande entomólogo brasileiro Prof. Dr. Angelo da Costa Lima dei ao órgão o nome de Órgão de Costa Lima.

BIBLIOGRAFIA

Earth, R.

1953. Métodos de trabalho na anatomia e histologia entomológica, Mem. do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. **51**:93-186.

Lever, R.

1930. A new endoskeletal organ in the hind legs of Halticinae, Zool. Anz. Vol. **92**: 287-289, 6 figs.

Maulik, S.

1929. On the structure of the hind femur in Halticinae beetle. Proc. Zool. Soc. London: 305-308, 3 figs.

ABREVIAÇÕES NAS FIGURAS

AB — *musculus abductor tibiae;* AS — dobra auxiliar da *placa S;* CA_1 — Primeira cavidade da parede do fêmur; CA_2 — segunda cavidade do fêmur; CD — bordo diagonal da *placa S;* DI^{1-3} — musculos dilatadores na *placa S;* EN — endocutícula; en — lado interno; EX — exocutícula; ex — lado externo; SE — fêmur; FK — células do corpo gorduroso; FTA — *musculus flexor tarsi;* FTI — *musculus flexor tibiae;* h — lado posterior; MA_1 — membrana da articulação; MC — massa colaginosa; N — nervo; PS — *placa S;* PT — *placa T;* SA — saliência distal da *placa T;* SH_{1-4} — tendões; SHFTI — tendão do *musculus flexor tibiae;* ST — tendão do *musculus flexor unguitractoris;* TH — trocanter; TI — tíbia; TR — traquéia; v — lado anterior.

UEBERSETZUNG

Der Sprungapparat der Halticine Homophoeta sexnotata Har. (Coleoptera)

(Mit 6 Abbildungen)

Prof. Dr. Angelo da Costa Lima machte mich auf die Sonderbildungen im Femur der Halticinen aufmerksam und bat um cine naehere Untersuchung der Funktion und Struktur. Da ich zur gleichen Zeit genuegend fixiertes

Material durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Dr. Wanderbilt Duarte de Barros, Administrador des Nationalparkes im Itatiaia-Gebirge, zur Verfuegung hatte, waehlte ich fuer die vorliegende Untersuchung die Art *Homophoeta sexnotata*, die den Vorteil bietet, dass der Femur nicht pigmentiert, sondern gelblich transparent ist.

In der Literatur wird der Apparat erstmalig von Maulik (1929) einer naeheren Pruefung unterzogen. Er fand ihn in einer Anzahl von Halticinen-Arten. Bei der Untersuchung einer sehr grossen Anzahl brasilianischer Arten stellten Costa Lima und der Autor in jedem Falle das Vorhandensein dieser Bildung fest. Maulik beschrieb den Apparat als endoskelettale Bildung, die er als Erweiterung einer Sehne zutreffend betrachtete. Ueber die Funktion vermutet er, dass es sich um ein Organ handelt, das diesen Kaefern das Springen erlaubt. Ueber den Mechanismus macht er keine naeheren Angaben, auch zieht er nicht die Verteilung der Muskulatur im Femur in Betracht. Die von ihm in den Figuren angedeuteten Muskeln sind zweifellos nur die Sehnen, da er durch Behandlung mit KOH alle Gewebsteile, auch die Muskeln, zerstoerte, wie er im Anfang seiner Arbeit angibt. Eine Erweiterung dieser Mitteilung stellt die Arbeit von Lever dar (1930), der im inneren Winkel des Femur-Tibia-Gelenks eine weitere endoskelettale Bildung in Form eines verbreiterten Stueckes einer Sehne fand. Eine Deutung nimmt Lever ebenfalls nicht vor, obwohl er vermutet, dass diese Struktur zum Springen dient.

Zwar zeigt das Hinterbein der Halticinen "saltatorial modifications", wie Lever sagt, aber es ist doch kein Sprungbein wie etwa das der Heuschrecken. Gerade dieser Unterschied ist so ins Auge springend, dass die Sprungfaehigkeit der Halticinen den Beobachter in Erstaunen setzt. Es lag nun nahe zu vermuten, dass die Sonderbildung des Femurs dazu dient, das lange Sprungbein der Heuschrecken funktionell zu ersetzen.

Bei der bearbeiteten Art ist der Femur mit 2,7 mm Laenge nur 0, 3 mm laenger als die Tibie. Dagegen ist er stark angeschwollen und besitzt in der Mitte einen Durchmesser von 1,245 mm.

Oeffnet man durch einen Schnitt laengs der Innen-und Aussenkanten den Femur bei ausgestreckter Tibie und hebt die Hinterplatte des Femurs ab, so bietet sich das Bild der Figur 2. Durch den medianen Schnitt erscheinen nicht die vorderen und hinteren Condylen am apikalen Ende, die mit zwei Vertiefungen der Tibie das Femur-Tibia-Gelenk bilden. Die Lage des Drehpunktes der Tibie ist durch einen Pfeil markiert. Am Ende der Tibie inseriert eine breite starke Sehne (SH_1), die im normalen Insektenbein die Sehne des *musculus abductor tibiae* darstellt. Sie inseriert mit ihrem basalen Ende an dem von Maulik beschriebenen Organ. Die Form dieses Organs geht aus den Figuren 3a und 3b hervor, wie auch aus dem Querschnitt 4a. Es stellt eine etwa 1.050 µ lange und in der Ruhelage 540 µ breite Platte dar, die in der Querrichtung symmetrisch S-foermig gekruemmt ist. Der groessere Bogen dieses im folgenden "Platte S" genannten Teiles ist mit seiner konvexen Seite nach hinten gerichtet. Am Aussenrand (Fig. 4, ex) biegt ein schmaler Rand nach hinten, an der inneren Femurkante ((Fig. 4, en) ein grosser Bogen nach vorne um. Dieser letztere Bogen (Fig. 5) wird distalwaerts kleiner, so dass sein Rand eine schraege Kante darstellt. An

dieser Kante inseriert eine lange und breite Sehne (SH_2), von MAULIK als Muskel angesehen. Eine histologische Pruefung des Ansatzes dieser Sehne zeigt durch den Verlauf der Exo- und Endocuticula eindeutig, dass der S-foermige Cuticularkoerper lediglich eine Modifikation der Abduktorsehne darstellt, die als blattartige, gekruemmte Erweiterung der Sehne seitlich ansitzt. In Fig. 4b erkennt man, dass (schwarz gezeichnet) die Endocuticula, aus der die Sehne fast ausschliesslich besteht, in der Platte S sehr duenn wird und eine starke doppelte Schicht von Exocuticula einschliesst, die stark sklerotisiert, durch eine Kittmasse (MC) zusammengehalten wird. Von der aeusseren und inneren Kante der Platte S entspringen Muskeln, die als Dillatatoren (DI 1-2) bezeichnet werden und an der Aussen- bezw. Innenkante des Femurs inserieren. An der hinteren distalen Ecke inseriert mit einer Sehne (SH_4) ein dritter Dillatator (DI_3). An der starken Sehne SH_2 entspringt eine grosse Anzahl von Muskelbuendeln, die strahlenfoermig nach allen Seiten abgehen (in Fig. 2 z.T. entfernt). Alle Muskeln, die an der Platte S und an ihren Sehnen ansetzen, sind als Teile des *musculus abductor tibiae* aufzufassen. Eine Kontraktion dieser Muskeln bewegt die Platte S in den Femur hinein und streckt damit die Tibie. Die Gegenbewegung erfolgt durch den *musculus flexor (adductor) tibiae*, der eine Gruppe von Muskeln zusammenfasst, die nach hinten zu im Raum hinter der Platte S und dem Abduktor liegen. Die zugehoerige Sehne (SH_2) inseriert ein kurzes Stueck distalwaerts vom Drehpunkt der Tibie (siehe Pfeil in Fig. 2). Diese Sehne liegt in der hinteren Gelenkmembran eingeschlossen. Sie ist nur kurz und geht bald schon in ein staerker cuticularisiertes Stueck ueber, das bei ausgestreckter Tibie von hinten gesehen als kleines, braunes, dreieckiges Skelettstueck auf der hellen Gelenkmembran erscheint. Es wird im folgenden Platte T genannt und entspricht dem von LEVER beschriebenen Organ. Histologisch betrachtet ist es wie die Platte S eine Erweiterung und Verstaerkung einer Sehne, der Sehne des *musculus flexor tibiae*. Am Ende dieses etwa 300 µ langen Stueckes setzt sich die Sehne als solche in typischer Form fort und nimmt Kontakt mit den Muskelbuendeln auf. Im inneren Teil des Femurs liegt noch eine kleine Muskelgruppe, deren Sehne, durch Tibie und Tarsus laufend, zum Praetarsus geht und die Krallen bewegt. Die Form der Platte T geht aus den Figuren 6a — c hervor. Wichtig fuer das Verstaendnis des Mechanismus des Sprungs ist die Erhoehung an der distalen hinteren Kante der Platte T. Beide Platten wirken beim Sprung zusammen als ein komplexes Organ wie twa der Sprungmechanismus der Elateriden der auch als Komplexorgan aufzufassen ist. Zu Ehren meines guten Freundes PROF. DR. ANGELO DA COSTA LIMA nenne ich diese Form eines komplexen, bisher noch nicht in der Literatur funktionsanatomisch beschriebenen Organs das "COSTA LIMA'SCHE ORGAN".

Innerhalb der Hoehlung der Platte S findet sich eine Gruppe grosser Zellen (Fig. 4, FK), die an Fettkoerperzellen erinnern. Ihre Zellgrenzen sind ueberaus kraeftig und widerstandsfaehig; in ihrem Inneren finden sich starke fibrilloese Protoplasmastrukturen. Es kann vermuted werden, dass diese Zellen irgendeine mechanische Funktion besitzen oder vielleicht zur Kontrolle des Spannungsgrades innerhalb der Platte S dienen. Eine Innervierung oder Skolopidien wurden nicht gefunden.

Mechanismus des Costa Lima'schen Organs.

Bei ausgestreckter Tibie (Fig. 2) ist Platte S durch die vorhergegangene Kontraktion des Abduktors in den Femur hineingezogen worden. Der Endkopf der Tibie ist dank der grossen vorderen Gelenkhaut (*MA*1) ebenfalls in das distale Ende des Femurs eingetreten, da er als kleinerer Hebelarm vor dem Unterstruetzungspunkt der Gelenkkondyen liegt. Die Platte T dagegen ist, da ihre Sehne ausserhalb des Drehpunktes der Tibie inseriert, nach aussen getreten und liegt in der Gelenkhaut. Der Flexor ist weitgehend gedehnt, der Abduktor verkuerzt, jedoch nicht mehr im Zustand aktiver Kontraktion. Bei Rueckehr in die Ruhelage kontrahiert sich der Flexor der Tibie.

Hierdurch tritt im hinteren Teil des Gelenks die Platte in den Hohlraum des Femurs ein. Diese Bewegung erfolgt solange, bis die Tibie in die hintere, flache Rinne des Femurs zu liegen kommt. Am Ende dieser Bewegung ist die Platte T soweit in den Femur eingedrungen, dass ihre distale, hintere verstaerkte Kante, die stark nach hinten vorspringt, in der flachen Hoehlung einrastet, die im Inneren vom Ende der oben genannten Rinne der hinteren Femurwand gebildet wird. Durch die Flexion der Tibie wird gleichzeitig der vordere distale Processus der Platte S, der durch seine Sehne (SH_1) mit dem Endkopf der Tibie verbunden ist, nach unten gezogen. Hiermit verlagert sich auch die ganze Platte S, bis ihre hintere distale Ecke in der zweiten, flachen Hoehlung oberhalb der oben beschriebenen ersten Hoehlung einrastet und an weiterer Verlagerung verhindert wird. Da die Bewegung jedoch weiter geht, erfolgt eine Spannungssteigerung in der Platte S, da der distale Processus weiter herabgezogen wird.

Wenn die Platte T in der (CA_1) eingerastet ist und der *musculus flexor tibiae* erschlafft, erfolgt duch die Spannung in der Platte S ein Zug am Tibienkopf, der die Tibie wieder strecken will. Letzteres aber ist verhindert durch die Platte T, die in dieser Lage in ihrer Hoehlung festsitzt. Auf diese Weise besteht in der Ruhelage bei eingewinkelter Tibie eine ununterbrochene Spannung in der Platte S.

Im Augenblick des Sprunges beginnt der *musculus abductor tibiae* sich zu kontrahieren. Es kommt jedoch nicht zu einem Ausstrecken der Tibie, da die Platte T jede Bewegung unterbindet. Dafuer aber waechst durch die Kontraktion des Abduktors die Spannung in der Platte S ganz bedeutend, da die drei Dillatatoren, die auch Teile des Abduktors sind, da sie an derselben Sehne inserieren, die Woelbung der elastischen Platte abflachen. Die Kruemmung der Platte S wird noch durch eine sekundaere Woelbung (*AS*) verstaerkt. Der dritte Dillatator hat ueberdies die Aufgabe, die Ecke der Pl[illegible] S, an der er inseriert, in ihrer Lage zu halten. Die bedeutendste Steigerung der Spannung in der Platte S wird hervorgerufen durch die Kontraktion der grossen Muskelmenge, die an der grossen Sehne der Platte S inseriert. Durch diese Kontraktion wird die schraege Laengskante (CD) der Platte nach aussen, gezogen, wodurch die S-Form weiter geoeffnet wird. Die gesamte Spannung kann sich nur dadurch loesen, dass der Kopf der Tibie in den Femur eintritt, d. h. dass die Tibie gestreckt werden muss. Das ist aber nichtmoeglich, da die Platte T immer noch in ihrer Lage fixiert ist. Die Sehne zwischen Tibie und Platte strafft sich natuerlich voellig, wodurch die Tibie Gelegenheit hat, sich mit ihrem starken Enddorn und den distalen Dornenkraenzen auf der Unterlage festzuheften.

Zur Loesung der Spannung und damit zum Zustandekommen des Sprunges muss die Platte T aus ihrer Hoehlung heraustreten. Dies erfolgt automatisch im Augenblick der staerksten Kontraktion des Abduktors vermittels der schraegen Laengskante (*CD*), an die sich die Platte T eng anlegt. Durch die Verlagerung von CD nach aussen erfolgt ein schraeger Druck auf die Platte T, die ploetzlich aus ihrem Lager herausschnellt. Jetzt kann die gesamte, in der Platte S gesammelte Spannung und die Kontraktion des Abduktors sich auf die Tibie auswirken, die so mit betraechtlichem Kraftaufwand gestreckt wird und dem Koerper des Kaefers einen kraeftigen Antrieb zum Sprung verleiht. Nach einen Sprung von 1-2 m Weite hat das Tier die Fluegel geoeffnet und fliegt selbstaendig weiter. Dieser Mechanismus wurde von der menschlichen Technik im Katapultstart von Flugzeugen nacherfunden, nur dass die Konstruktion hier beim Insekt wesentlich besser ist, da der Sprungmechanismus am fliegenden Objekt angebracht ist.

Das biologische Grundprinzip ist, innerhalb des Femurs unmittelbar vor dem Sprung genuegend Spannung hervorzurufen, damit im Augenblick des Absprungs die Beschleunigung ausreicht, um dem Feind zu entkommen, was beim umstaendlichen Oeffnen der Fluegel in Frage gestellt waere.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird der Sprungmechanismus der Halticine *Homophoeta sexnotata* beschrieben.

Der Apparat liegt im Femur und besteht aus einer S-foermig gebogenen Cuticularplatte und einer kleineren dreieckigen Platte, die beide aus den Sehnen des Abduktors und des Flexors der Tibie entstanden sind und mit diesen noch zusammenhaengen. Durch die Zusammenarbeit beider Platten wird die Sehne des Abduktors (Sprungmuskel) sehr stark gespannt. Die Spannung sammelt sich in der S-foermigen Platte und fuehrt erst dann zum Strecken der Tibie, wenn die Dreiecksplatte, die in der Ruhelage in einer Hoehlung der Femurwand einrastet, im Augenblick der staerksten Kontraktion des Abduktors durch die S-foermige Platte aus ihres Lage gedraengt wird. Ein Strecken der Tibie aus der Ruhelage ohne maximale Kontraktion des Abduktors ist wegen des Sperrmechanismus der Dreiecksplatte nicht moeglich. Dieses Organ wird zu Ehren von Prof. Dr. Angelo da Costa Lima das "Costa Lima'sche Organ" genannt. Das Organ hat eine allgemeine Verbreitung unter den Halticinen.

LITERATUR

SIEHE AM SCHLUSS DES PORTUGIESISCHEN TEILS.

ABKUERZUNGEN IN DEN ABBILDUNGEN

AB musculus abductor tibae; As Hilfsfalte in der Platte S. CA1, CA2 Erste und zweite Hoehlung der Femurwand; CD Diagonalkante der Platte S; DI1-3 Dilatatoren der Platte S; EN Endocuticula; en Innenseite; EO Exocuticula; ex Aussenseite; FE Femur; FK Fettkoerperzellen; FTA *Musculus flexor tarsi;* FTI *Musculus flexor tibiae;* h Hinterseite; MA1 Gelenkhaut; MC Kittmasse; N Nerv; PS Platte S; PT Platte T; SA Distaler Vorsprung der Platte T; SH 1-4 Sehnen; SHFTI Sehne *des musculus flexor tibiae;* ST Sehne des *musculus flexor unguitractoris;* TA Trochanter; TI Tibie; TR Trachee; v Vorderseite.

SUMMARY

This paper deals with the saltatorial mecanism of the halticinae beetle *Homophoeta sexnotata* (*Chrysomelidae*).

The apparatus lies in the femur and consists of a S-formed bent plate of cuticular material and a triangular smaller one both plates originating from the tendon of the abductor respectively of the flexor of the tibia and still hanging together with these. When the *musculus flexor tibiae* is contracted the triangular plate enters into the femur until its external edge is caught in a cavity of the inner side of the wall of the femur; simultaneously the bent plate that represents an enlargment of the tendon of the *musculus abductor tibiae*, becomes more dilated, causing a strong tension in it. During the relaxation of the flexor the tension in the bent plate only effects on the triangular plate which now remains fixed in the cavity. This plate, an enlargment of the *musculus flexor tibiae*, prevents the backward movement of the tibia. When now the abductor is contracted, the tension in the bent plate will encrease because of its extremity is rising a large tendon on which is fixed the larger part of the abductor. Moreover, three other parts of the abductor are fixed directly or by means of a tendon on the sides of the plate. These muscles are called dilatatores. The tension which will lead to extend the tibia for jumping of the beetle, cannot effect on the articulation jet because the triangular plate prevents every movement. On the summit of the contraction of the abductor a transverse edge of the bent plate is pressed against the triangular plate, this is slowly shifted to the side and at last jerks suddenly out of its bed. Now all the accumulated tension, intensified by the contractive power of the large abductor, reacts upon the articulation of the tibia. The tibia extends with a violent power and shoots the beetle for some meters ahead. During the jump the insect opens its wings to fly independently. Biologically considered, this apparatus offers to the animal a great advantage: In danger the beetle takes off immediatly without losing precious time for opening the wings.

The organ is generally found in halticinae. In honour of the great Brazilian entomologist Prof. Dr. Angelo da Costa Lima this organ is proposed to be called the "Organ of Costa Lima".

Fig. 1

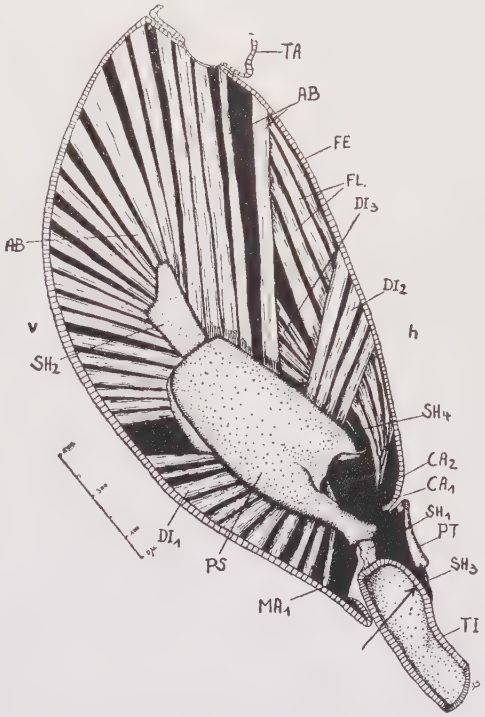


Fig. 2

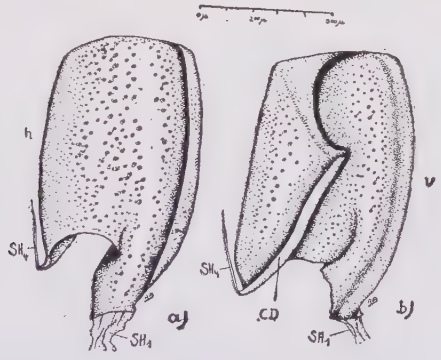


Fig. 3

Fig. 1. *Homophoeta sexguttata* com uma perna posterior esticada e a outra dobrada; as outras pernas foram cortadas. (Abdomen diminuido pela conservação). (Foto: José de Carvalho Filho).

Fig. 2. Fêmur esquerdo aberto, vista do lado interno, uma parte dos feixes musculares do abdutor cortada. Tíbia distendida. A seta indica a posição do ponto giratório da articulação.

Fig. 3. A placa S. a) vista do lado interno, b) vista de frente.

Fig. 1. *Homophoeta sexguttata* mit gestrecktem und eingewinkeltem Hinterbein, Vorder und Mittelbeine entfernt. Abdomen durch Konservierung geschrumpft. (Foto José de Carvalho Filho).

Fig. 2. Linker Femur von innen geoeffnet, ein Teil der Muskeln des Abduktors entfernt. Tibie ausgestreckt. Der Pfeil deutet die Lage des Gelenk-Drehpunktes an.

Fig. 3. Platte S. *a*) von innen, *b*) von vorne gesehen.

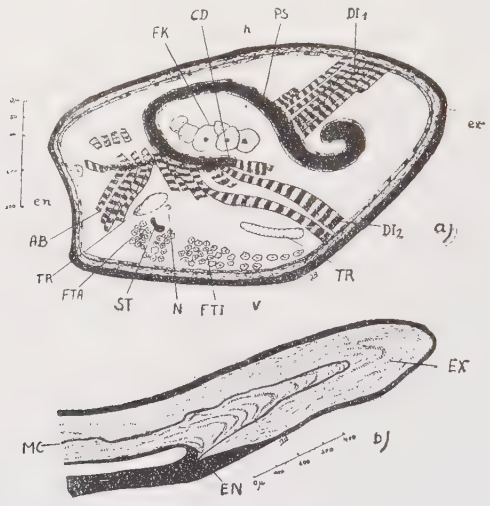


Fig. 4

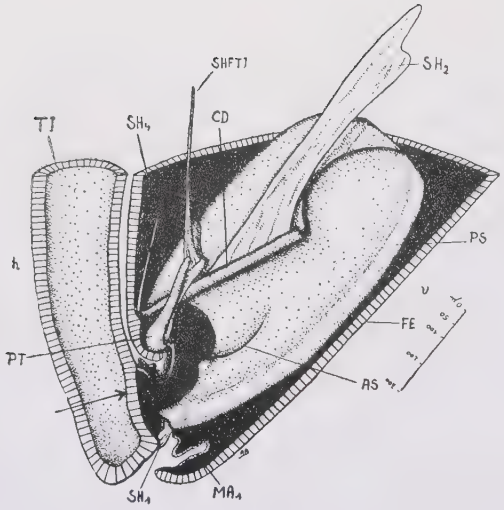


Fig. 5

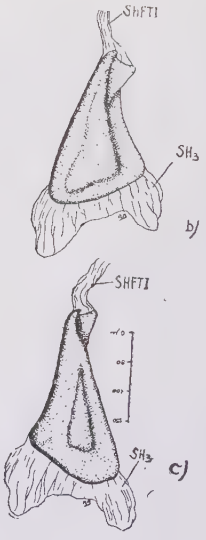


Fig. 6

Fig. 4 *a*) Corte transversal do fêmur na altura do centro da *placa S*, b) Inserção do tendão, fortemente aumentada (apenas as partes cuticulares).

Fig. 5 Parte distal do fêmur esquerdo aberta, vista do lado externo; músculos retirados, com tendões. Tíbia dobrada. A seta indica o ponto giratório da articulação.

Fig. 6. A placa T. a) vista de lado, b) vista do lado externo, c) vista do lado interno.

Fig. 4. *a*) Querschnitt durch den Femur in der Mitte der Platte S. *b*) Insertion der Sehne stark vergroessert (nur Cuticularteile).

Fig. 5. Distaler Teil des linken Femurs von aussen geoeffnet. Ohne Muskeln, mit Sehnen. Tibia eingewinkelt. Der Pfeil deutet die Lage des Gelenk-Drehpunktes an.

Fig. 6. Platte T. *a*) von der Seite, *b*) von aussen, *c*) von innen gesehen.

Excreção Urinária de 17-Cetoesteroides Neutros no Cavalo Normal e no Cavalo Castrado (*)

por

Fernando Ubatuba

O estudo da excreção urinária de esteróides em várias espécies animais, tem revelado aspectos curiosos do metabolismo dessas substâncias. Verificou-se assim que o touro excreta quantidades elevadas de pregnandiol (Marker, 1938), catabolito típico da progesterona de origem ovariana (femea) e corticoadrenal (macho e femea); o garanhão apresenta ainda anomalia mais curiosa: excreção urinária de quantidade de estrogênicos ainda muito mais elevadas das encontradiças na urina da égua prênhe (Zondek, 1934). Deulofeu & Ferrari em 1934 isolaram de 50 litros de urina de garanhão, 75 mg de estrona (identificada pelo ponto de fusão e pelo de seu benzoato). Haussler (1934) em trabalho mais minucioso, isolou e identificou a estrona de um concentrado de 130 litros de urina de cavalo normal, por meio das reações coradas dessa substância e de alguns de seus derivados (semicarbazona, oxima). Em 1935 Cartland também confirmou a presença de estrona na urina do garanhão, concluindo, entretanto, que sòmente 60% do material estrogênico isolado devesse ser estrona, sugerindo assim a possibilidade da ocurrência, nessa urina, de outros estrogênicos naturais. Recentemente (Levin, 1945) confirmou essa hipotese, isolando de uma amostra mista de urina de varios garanhões, um esterol alcoólico cristalino, estrogênico, identificado como α-estradiol (atualmente corrigido para β-estradiol) pela análise elementar e alguns derivados (di-α-naftoato); segundo Levin a urina do cavalo normal é a fonte mais rica de β-estradiol até hoje encontrada. Recentemente Jensen e col. (1945) demonstraram que, tal como se dá com a espécie humana, a excreção de estrona pela urina do cavalo normal se dá sob a forma de sulfato, pelo menos em parte.

Se bem que o próprio Zondek tivesse demonstrado em 1934 que a urina do cavalo castrado não possue atividade estrogênica, a importância do testículo em relação a esse particular só teve comprovação direta em 1940. Nessa data Beal isolou a estrona pelo fracionamento de um extrato de testículo de cavalo com o reativo de Girard (identificada pelo seu 3:5-dinitrobenzoato) e o estradiol (identificado pelo seu di-α-naftoato). Segundo esse autor o testículo do cavalo é cerca de 20 vezes mais rico em material estrogênico do que o ovário da porca, tendo obtido, por quilo de orgão fresco, 210 mg de estradiol e 360 mg de estrona cristalina.

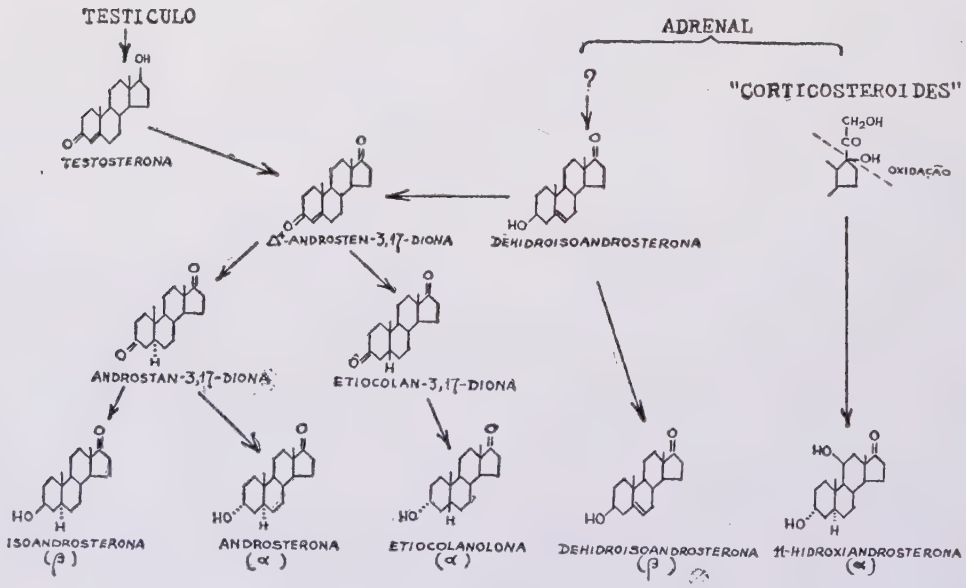
(*) Trabalho apresentado como tése de concurso para a Escola Nacional de Veterinária da Universidade Rural (1951).

E' interessante assinalar que o centro de interesse das pesquisas sôbre o metabolismo dos esteróides hormonais nessa espécie, foi sempre os esteroides estrogênicos. Não encontramos na literatura nenhuma referência à eliminação de pregnandiol e, em relação aos esteróides androgênicos, a literatura é particularmente escassa. O único trabalho a respeito, de que temos conhecimento, é o de GUSTAVSON (1939), onde aparece, em uma tabela o valor de 8 u.i. para o garanhão, sem maiores esclarecimentos sôbre a natureza e condições do teste biológico empregado.

A excreção de pequenas quantidades de material androgênico em animal cujos testículos são particularmente ricos em testosterona (TAGMAN, 1946) faz pensar na revisão dos dados de GUSTAVSON; pode acontecer também, e esse fato seria muito curioso, que a baixa excreção de material biologicamente ativo corra a conta de uma metabolização particular da testosterona, havendo nessa espécie, uma linha de degradação metabólica diferente daquela já parcialmente verificada em outros animais. A discrepância entre os valores obtidos com os testes biológicos e os testes químicos pode correr a conta de uma diferença qualitativa, os metabolitos urinários ricos em esteróides biologicamente inativos, como a etiocolanolona, justificando valores altos para os testes químicos que empregam a reação de ZIMMERMANN com o m-dinitrobenzeno.

De qualquer modo, o "pattern" metabólico dos esteroides sexuais no cavalo é original, e os estudos do metabolismo dos esteróides androgênicos talvez nos permitam lançar um pouco de luz na aventada transformação de androgênicos em estrogênicos, utilizando essa espécie animal.

ESQUEMA 1



Não encontramos dados sôbre a excreção de 17-cetoesteróides no cavalo, seja normal seja castrado. Se nessa espécie a testosterona de origem testicular é metabolizada para 17-cetoesteróides neutros, como se admite para outras espécies (Koch, 1942; Lieberman & Dobriner, 1948; Samuels, 1949; Mason & Kepler, 1945; Clark & Kochakian, 1947; Kochakian, 1949) pode acontecer que a pequena excreção de material androgênico seja devida à predominancia de metabolitos biologicamente inativos (etiocolanona ?). O primeiro ponto a ser verificado, então, é a excreção de 17-cetoesteróides neutros, tanto no cavalo normal, quanto no castrado. Impõe-se, a seguir, a análise qualitativa dos esteróides neutros normalmente excretados e o estudo dos metabolitos após administração artificial dos precursores já conhecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

a) COLHEITA

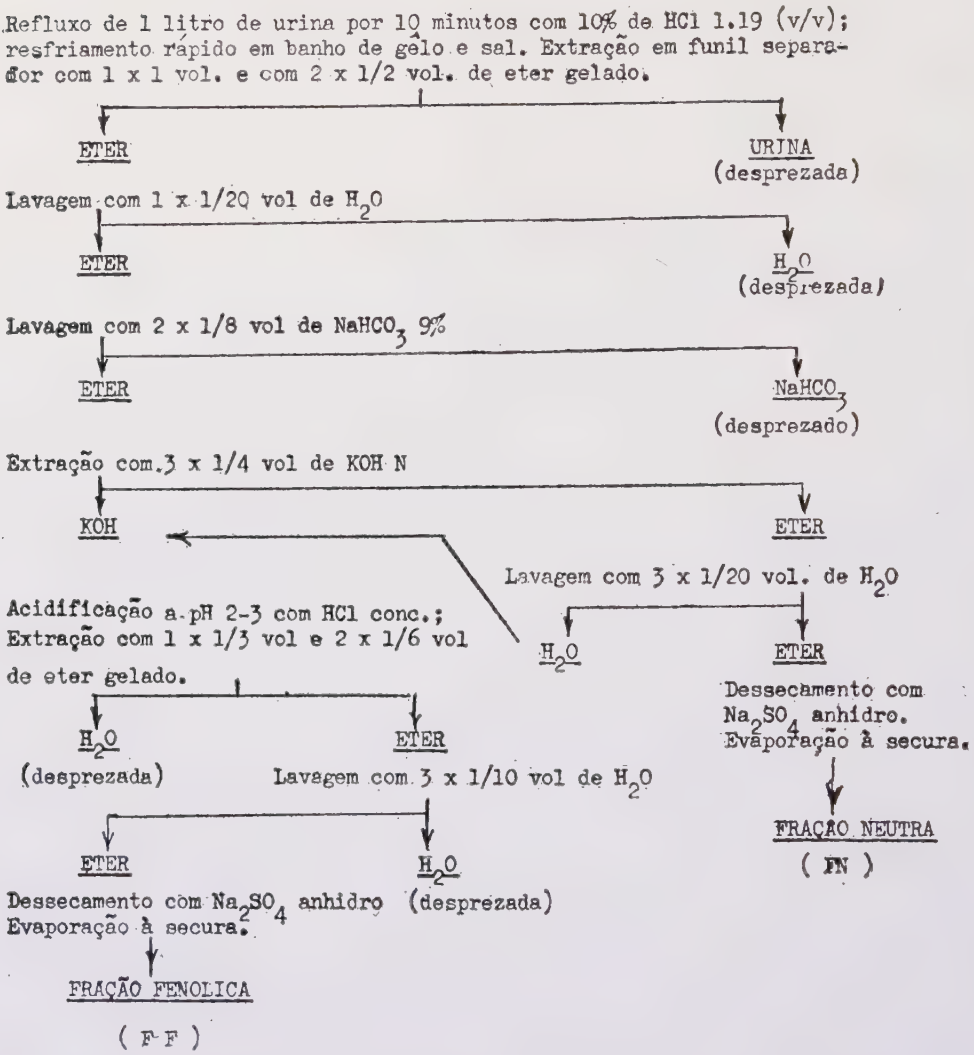
Empregamos neste trabalho 12 cavalos de um lote de 15 animais adquiridos pelo Instituto para os seus serviços de produção de sôros, os quais foram separados e aclimatados às condições particulares de cativeiro. A ração básica administrada constou sempre de alfafa, milho e gramíneas frescas, a água administrada "ad libitum" exceto durante os períodos de colheita da urina (restrição a uma ingestão apenas em 24 horas). O lote de 6 animais castrados foi composto de animais com 260 a 340 quilos (7.5 a 12 anos) e o lote de normais, com pesos entre 250 e 300 quilos (4 a 9 anos). Para a colheita da urina usamos uma baia cimentada, com inclinação adequada para que a urina fosse toda coletada numa manilha vidrada, despejando diretamente num garrafão de vidro com o conservador; a construção do piso foi feita de modo a formar-se um degráu ao nível do trem posterior do animal, com o que as fezes foram praticamente eliminadas por separação mecânica. O controle obtido pela aspersão de 1 litro de água sôbre o piso nos mostrou ser possivel uma recuperação de 97% dos volumes despejados. Experiências prévias nos mostraram que a urina recem emitida tem pH entre 6.8-7.4 (amostras de 4 animais diferentes) mas que, mesmo com 20 ml de clorofórmio e 30 ml de álcool absoluto adrede colocados no garrafão, a alcalinidade sobe para pH 8.0-8.5. Passamos a usar, então, sistemàticamente, o mesmo conservador adicionado de 50 a 100 ml de HCl concentrado. Nestas condições, a urina coletada por 18-24 horas teve sempre pH entre 3 e 5. A urina teve o seu volume medido e conservado a seguir a +5°C. Os diferentes volumes urinários variaram de 3.2 litros a 8.6 litros, com a restrição de água durante o dia da colheita. Alíquotas de 1 litro foram imediatamente submetidas à hidrólise ácida.

b) HIDRÓLISE E EXTRACÇÃO

A hidrólise foi feita por refluxo com HCl concentrado (10% v/v) e a extração com eter praticada em funís separadores. Toda a vidraria empregada tem juntas esmerilhadas, eliminando-se assim o contato com rolhas de cortiça ou borracha; as torneiras foram lubrificadas com agar a 1% (DIFCO). O eter foi purificado dos peróxidos pela agitação com solução de sulfato ferroso a 2% e a seguir lavado com água e conservado gelado at o seu emprego (dentro de 24 horas). Os esquêma 2 mostra a marcha das extrações e purificação das frações que empregamos.

ESQUEMA 2

HIDROLISE E EXTRAÇÃO DA URINA


Refluxo de 1 litro de urina por 10 minutos com 10% de HCl 1.19 (v/v); resfriamento rápido em banho de gêlo e sal. Extração em funil separador com 1 x 1 vol. e com 2 x 1/2 vol. de eter gelado.
ETER
URINA (desprezada)
Lavagem com 1 x 1/20 vol de H2O
ETER
H2O (desprezada)
Lavagem com 2 x 1/8 vol de NaHCO3 9%
ETER
NaHCO3 (desprezado)
Extração com 3 x 1/4 vol de KOH N
KOH
ETER
Lavagem com 3 x 1/20 vol. de H2O
Acidificação a pH 2-3 com HCl conc.; Extração com 1 x 1/3 vol e 2 x 1/6 vol de eter gelado.
H2O
ETER
Dessecamento com Na2SO4 anhidro. Evaporação à secura.
FRAÇÃO NEUTRA (FN)
H2O (desprezada)
ETER
Lavagem com 3 x 1/10 vol de H2O
ETER
H2O (desprezada)
Dessecamento com Na2SO4 anhidro
Evaporação à secura.
FRAÇÃO FENOLICA (F F)

c) FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO NEUTRA PELO REATIVO DE GIRARD "T"

O reativo "T" de GIRARD (1936) empregado foi testado com colestenona obtida no laboratório por oxidação do colesterol de cerebro bovino (p.f. 148-148,5°C) por meio do acido crômico, com previa proteção da ligação dupla com bromo (WINDAUS, 1906). Obtivemos um derivado cristalino que recristalizado de metanol-acetona acusou p.f. = 230-232°C.

Também foi verificada a capacidade de fixação do reativo pela reação com uma amostra de acetato de dehidroisoandrosterona (MERCK) adicionada à fração não cetonica de urina de cavalo; a eficiência do fracionamento foi avaliada pela relação D_{520}/D_{420} do produto da reação com o m-dinitrobenzeno (ver pág. 143).

A técnica de fracionamento empregada foi a seguinte:

1. Evaporar alíquota do extrato alcoólico, no banho, dágua, em Erlenmeyer de 25ml.

2. Adicionar 200 mg de reativo de Girard e 0.5 ml de CH_3COOH glacial.

3. Tampar os frascos com folha de estanho e aquecer durante 10 minutos a 100°C (banho de óleo).

4. Resfriar ràpidamente em água corrente, juntar 7 ml de eter purificado e transferir para funil separador de 125 ml com a ajuda de 40 ml de água destilada encerrando 300 mg de KOH.

5. Extrair a mistura com 1 x 50 ml e com 2 x 30 ml de eter; a fração não cetônica fica no eter enquanto que a fração cetônica está solubilizada na água.

6. Acidificar a fáse aquosa com 1 ml de H_2SO_4 concentrado e deixar 2 horas ao ambiente.

7. Lavar a fáse etérea com 3 x 30 ml de água destilada, secar com Na_2SO_4 anhidro e evaporar no banho dágua a 60°C, (FNC).

8. Decorridas as 2 horas de hidrólise da fração aquosa anterior, adicionar 1 ml mais de H_2SO_4 concentrado e extrair em funil separador de 250 ml com 4 x 40 ml de eter.

9. Reunir os extratos etéreos, lavar com 3 x 20 ml de água destilada, secar com Na_2SO_4 anhidro e evaporar no banho dágua à secura (FC).

d) DETERMINAÇÃO QUÍMICA DOS 17-CETOESTEROIDES

1. m-DINITROBEZENO. O reativo comercial, ou o obtido no laboratório por síntese a partir do benzeno(livre de tiofeno), encerra sempre dinitrotiofeno suficiente para interferir no produto da reação com os esteróides. A purificação mais eficiente é a proposta por VILLGERODT (18)

1. Dissolver 15 g de m-dinitrobenzeno em 500 ml de álcool absoluto livre de aldeidos (basta o tratamento "standard" com óxido de chumbo), a 40°C.

2. Adicionar 100 ml de KOH 2N com forte agitação e continuar a agitação por 5 minutos, mantendo a temperatura em torno de 40 °C.

3. Esfriar em água corrente e despejar sobre 2 litros de água destilada.

4. Coletar o precipitado em funil de Büchner na trompa e lavar até que as águas de lavagem saiam incolores e neutras.

5. Transferir os cristais para cristalizador e secar no vásio sulfúrico por 24 horas.

6. Recristalizar duas vezes de alcool absoluto purificado, com resfriamento lento para se formarem agulhas longas.

7. Triturar e secar no vasio sulfúrico. As agulhas bem claras devem ter p.f. 90-91°C (capilar, não corrigido). A pureza deve ser testada pela dissolução de pequena amostra em alcool: à solução juntar igual volume de KOH 2N e deixar 1 hora ao ambiente (não deve desenvolver-se coloração avermelhada).

2. ALCOOL. Empregamos sempre alcool absoluto de boa qualidade destilado sobre CaO e posteriormente refluído 4 horas com aluminio metalico e KOH (para cada 300 ml de alcool, 3 g de aluminio e 3 g deKOH em pastilhas); foi aproveitado sempre o terço central do destilado. O controle do alcool é feito rotineiramente por prova em branco, medindo-se a densidade ótica do produto da reação de Zimmermann a 520 mμ (brancos ótimos dão valores abaixo de 0.2).

3. KOH. Usamos sempre uma mesma partida de KOH em pastilhas (Baker ACS).

4. ANDROSTERONA. A nossa amostra de androsterona Schering foi seca no vasio em pistola sôbre anhidrido fosfórico a 100°C durante 1 hora. (p.f. = 184-185°C não corrigido). A determinação da absorção ultravioleta da solução alcoolica (2mg/ml) foi feita em espectrofotómetro Beckman DU tendo sido encontrado um máximo de absorção a 290,5 mμ com cuba de 1 cm (segundo HOGNESS e col. o máximo da androsterona pura fica a 292.5 mμ).

e) TÉCNICA DA REAÇÃO

A determinação química dos 17-cetoesteróides foi feita empregando-se o sistema de CALLOW e col. (1938) com KOH alcoólica 2.5N±0,2 e solução alcoólica de m-dinitrobenzeno a 2%, recentemente preparadas. A calibração foi feita a 30.4°C±0.05° (banho "Precision" com relay MERC-to-MERC), deixando-se a côr se desenvolver no escuro durante 60 minutos.

1. Colocar em tubos pyrex com rolha esmerilhada (30 ml de capacidade), 0.2 ml de extrato alcoólico (contendo de 40 a 150 μg de esteróides), 0.2 ml de solução a 2% de m-dinitrobenzeno e 0.2 ml de KOH 2.5N (a tempo zero).

2. Agitar, arrolhar e imergir em banho dágua a 30.4°, no escuro, durante 60 minutos.

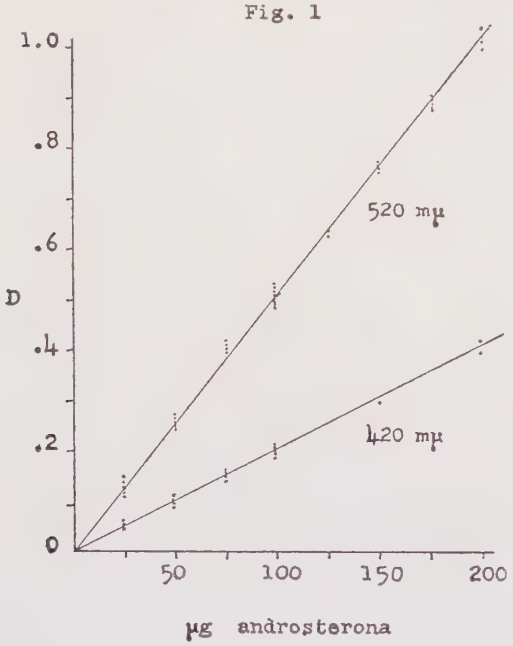
3. Diluir com 10 ml de álcool absoluto comum e lêr a densidade ótica a 420 mμ e a 520 mμ com o branco a 100% de transmissão dentro de 3-5 minutos.

4. Calcular a relação D_{520}/D_{420}, achar o fator "f" na tabela de correção e multiplicar pela leitura a 520 mμ para obter $D_{cor.}$

5. Calcular a concentração em μg na alíquota de modo habitual, pela concentração do padrão, Calcular e excreção urinária por 24 horas.(*)

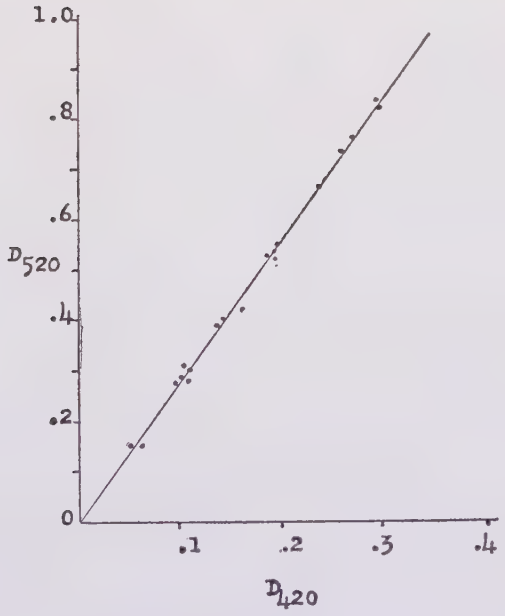
(*) Nota: As determinações foram feitas sempre em duplicata. Em cada série de medidas foi introduzido um tudo com 100 μg de androsterona (resíduo da evaporação da solução alcoólica «stock»). Ajustamos sempre o valor da alíquota de extrato de modo a que as leituras da côr final fossem sempre feitas entre os limites 0,200 e 0.700 de densidade ótica.

Fig. 1



Curva de calibração com androsterona. Espectro fotometro Coleman Universal. Cuba de 13 mm quadrangular

Fig. 2



Reta de regressão das leituras a 520 mμ e a 420 mμ da côr desenvolvida com androsterona. Espectro-fotometro Coleman Universal. Cuba quadrangular de 13 mm.

f) CORREÇÃO DE CÔR PARA CROMOGÊNIOS E PIGMENTOS INESPECÍFICOS

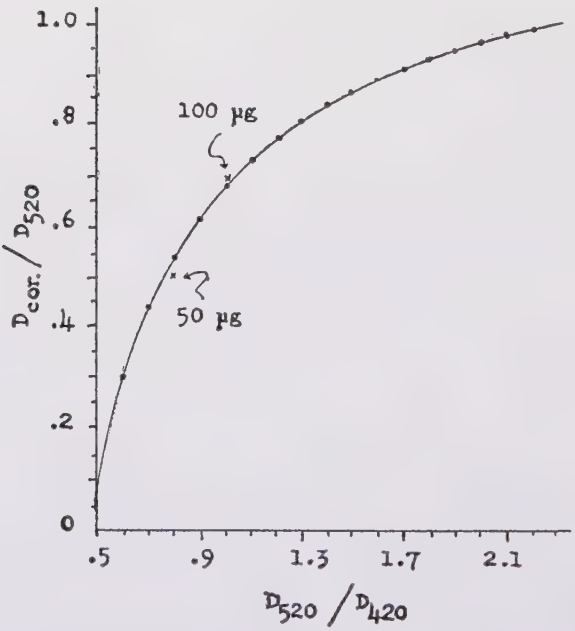
A análise da côr de uma mistura de dois componentes, como no caso, presente, pode ser feita pela medida da absorção luminosa em dois comprimentos de onda que correspondam aos máximos de absorção dos dois componentes, respectivamente (VIERORDT, 1873). Utilizamos a equação (1), sendo k_p obtido com a FNC (separada com acethidrazida de GIRARD) de urina de cavalo castrado (k_p=2.16) e normal (k_p=2.18); k_e foi obtido com androsterona pura (k_e=0.41).

$$D_{cor.} = \frac{k_p \cdot D_{520} - D_{420}}{k_p - k_e} \qquad (I)$$

A curva teórica de correção (Fig. 3) foi obtida fixando-se D_{520} em 0.500. Para as várias relações D_{520}/D_{420}, que oscilam entre 0.50 (pigmentos puros) e 2.30 (androsterona), calculam-se facilmente os valores de D_{420} teóricos, os quais, por substituição nos dão os valores de $D_{cor.}$ Chamando-se de f à relação $D_{cor.}/D_{520}$.

$$D_{cor} = f.\ D_{520}$$

Fig. 3



Curva teorica da equação

$$D_{cor} = \frac{K_p \cdot D_{520} - D_{420}}{K_p - K_e}$$ fixando-se

D_{520} a 0,500, mostrando a aderencia dos pontos experimentais com 50 µg e 100 µg de dehidroisoandrosterona.

Os valores de *f* estão na tabela 1.

TABELA 1

D_{520}/D_{420}	f	p.p. (*)
0.5	0.11	0.019
0.6	0.30	0.014
0.7	0.44	0.010
0.8	0.54	0.008
0.9	0.62	0.006
1.0	0.68	0.005
1.1	0.73	0.005
1.2	0.78	0.003
1.3	0.81	0.003
1.4	0.84	0.003
1.5	0.87	0.002
1.6	0.89	0.002
1.7	0.91	0.002
1.8	0.93	0.002
1.9	0.95	0.002
2.0	0.96	0.001
2.1	0.97	0.001
2.2	0.99	0.001
2.3	1.00	

(*) Partes proporcionais para interpolação

RESULTADOS

Os resultados experimentais estão condensados na tabela 2. A inspecção dos valores do erro padrão nos mostra que nos animais castrados a excreção de 17-cetoesternodes neutros é mais homogênea do que os animais normais. No gráfico 1 resumimos os valores encontrados de modo a nos permitir uma idéia de conjunto, especialmente assinalar o paralelelismo entre os valores obtidos com a FN total e com a FC em ambos os grupos.

Como era de esperar, os animais normais excretam maiores quantidades de 17-cetoesteróides neutros, a diferença entre as duas médias, com a fração cetônica, sendo significativa ao nivel de 0.05. Parece então que nessa espécie também o testículo, além da adrenal, contribue para o aparecimento desses metabolitos na urina; isto não seria de estranhar, uma vez que o testículo do cavalo produz quantidades relativamente grandes de hormônio androgênico, como é de inferir-se do trabalho de TAGMAN. Se bem que ainda não possamos dizer nada sôbre a natureza química desses metabólitos urinários, é de prever-se que no cavalo também a testosterona seja metabolizada para *iso*-androsterona, androsterona e etiocolanolona (ver esquema 1).

TABELA 2

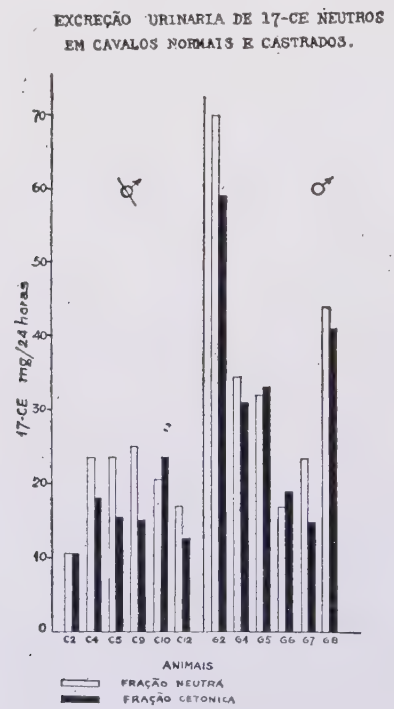
EXCREÇÃO DE 17-CETOESTEROIDES NEUTROS URINÁRIOS NO CAVALO

ANIMAL	CONDIÇÃO	17—CETOESTERÓIDES mg/24 horas	
		FRAÇÃO NEUTRA	FRAÇÃO CETONICA
C2	Castrado	10.5	10.4
C4	»	23.5	17.8
C5	»	23.3	15.5
C9	»	25.0	15.0
C10	»	20.3	23.4
C12	»	17.0	12.3
$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (*)		20.0 ± 2.2	15.7 ± 1.8
G2	Normal	70.0	54.6
G4	»	34.3	31.8
G5	»	31.8	33.0
G6	»	16.8	19.4
G7	»	23.5	15.0
G8	»	46.5	41.4
$\bar{x} \pm S\bar{x}$		37.2 ± 7.7	32.5 ± 6.0

(*) $\bar{x}$ = média aritmética = $\frac{Sx}{n}$

$S\bar{x}$ = êrro padrão = $\sqrt{\frac{S(x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$

GRÁFICO I



DISCUSSÃO

A maior dificuldade encontrada na determinação química dos 17-cetoesteróides neutros urinários pela reação de Zimmermann é a interferencia dos pigmentos e dos cromogênios inespecíficos presentes nos extratos finais; os processos de purificação ainda deixam muito a desejar e as soluções propostas ainda são apenas soluções parciais. Das várias soluções usadas para o afastamento da interferência desses pigmentos e cromogênios, duas mereceram melhor acolhida pela constância dos resultados que fornecem: o emprego de correções de côr pelas chamadas "equações de correção" e o fracionamento dos extratos por meio dos reativos de Girard ("T" e "P").

No caso particular da determinação dos 17-cetoesteróides urinários do cavalo encontramos elevadas taxas de pigmentos préformados que chegam aos extratos finais, mesmo após a separação da fração cetônica com o reativo de Girard; tentativas feitas com albumina mostraram que é possível o seu afastamento, mas as recuperações de esteróides são baixas, aliás como ocorre com o emprego de outros adsorventes, tais como carvão, permutita, óxido de magnésio etc. Devido à estranha aderência desses pigmentos à fração cetônica, é possível que eles encerrem carbonila em sua estrutura, o que torna mais complicado o problema da purificação dos estratos da urina de cavalo. Para se ter determinações razoaveis com a fração neutra total, tivemos de empregar sempre grandes diluições do extrato, o que reduz a precisão das determinações (a precisão é tanto mais elevada quanto maior a relação esteróides/pigmentos). Muito provavelmente os valores absolutos por nós encontrados se afastam dos valores reais, quando se emprega a fração neutra total; todavia, a comparação dos valores nos dois lotes deve reter a sua significação.

Os resultados obtidos com a fração cetônica controlam perfeitamente os obtidos com a fração neutra, na maioria dos casos. A eficiência do fracionamento com o acethidrazida foi comprovada de duas maneiras. No primeiro caso fracionamos o resíduo da evaporação de 4 ml de solução alcoólica de dehidro*iso*androsterona (1 mg/ml) com 100 mg de reativo de Girard, obtendo-se 3930 µg (98.2% de recuperação). No segundo caso adicionamos uma quantidade conhecida de DHA a uma fração neutra de urina de cavalo castrado (205-FN) a qual foi fracionada e refracionada; o comportamento dessas frações em relação ao m-dinitrobenzeno nos mostrou que as frações não cetônicas ficaram praticamente livre de esteróides, mas que as frações cetônicas ainda encerram pigmentos ou cromogênios inespecíficos não identificados. (Tabela 3).

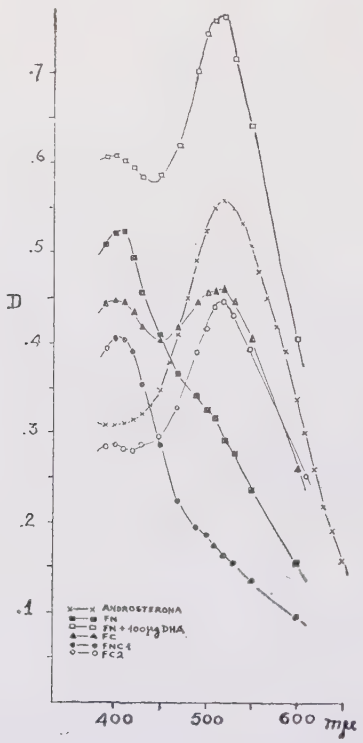
TABELA 3

PROVA DE FRACIONAMENTO COM O REATIVO DE GIRARD. FN DE URINA DE CAVALO ADICIONADA DE DHA

FRAÇÃO	D_{520}/D_{420}
FC_2	1.58
FC_4	1.86
FNC_1	0.42
FNC_2	0.84

Uma vez que a relação D_{520}/D_{420} guarda sempre um valor definido para os esteróides puros (acima de 2.0), decrescendo à medida que o esteróide é contaminado com impurezas até atingir valores da ordem de 0.4, para os pigmentos puros, achamos que os valores encontrados são significativos; pode-se concluir que o fracionamento funciona bem em relação aos esteróides, mas mal em relação aos pigmentos.

As curvas de côr dos produtos da reação nos revelam um pique de absorção caracteristico a 520 mμ (*) para as frações cetônicas, o que não ocorre com as frações não cetônicas (Gráfico 2, curvas FC_2 e FNC_1); no mesmo gráfico encontram-se as curvas de côr obtidas com a fração neutra de cavalo castrado (FN) sem o pique a 520 mμ, o qual aparece quando se adiciona DHA à mesma fração (FN+100μgDHA); a curva FC foi obtida com urina de cavalo normal e mostra a ocurrência dos dois piques.



Curvas de côr. Vêr o texto

Em vista das provas de recuperação e da análise dos nossos resultados, achamos que os valores obtidos com a fração cetônica são perfeitamente válidos para o cavalo, apesar da presença de grandes quantidades de pigmentos

(*) A rigor esse pique se sitúa exatamente a 510 mμ (determinações com espectrofotometro BECKMAN DU) mas, si bem que perceptivel, a diferença de absorção a 510 e 520 mμ é muito pequena quando se usa espectrofotommetro de grade (Coleman Universal, Unican etc...).

e cromogênios inespecíficos, os quais devem dar um erro para mais, nos valores encontrados. Entretanto, a análise estatística dos valores obtidos com as duas frações (neutra total e cetônica) mostram que a diferença observada não é significativa. Com isso, parece-nos que o uso das equações de correção de côr é válido também para a urina de outras espécies animais, além do homem. Tais equações foram introduzidas por SMITH (1930) e GIBSON & EVELYN (1938) para a solução de problemas de outra natureza e por FRAZER e col. (1941) TALBOT e col. (1942) e ENGSTROM & MASON (1943) para o caso particular da determinação dos 17-cetoesteróides na urina humana. As críticas teóricas ao emprego dessa correção, especialmente no caso de não se conhecer a natureza dos pigmentos inespecíficos, parece que não subsiste quando k_p é determinado com a própria fração não cetônica total e se utiliza a potassa alcoólica para a reação de Zimmermann; a discrepância observada quando se usa a potassa aquosa (HOLTORFF & KOCH, 1940) parece ser devida ao fato de que nessas condições não é obedecida a lei de BOUGUER-BEER. O controle da reação foi então feito adicionando a uma fração fortemente pigmentada quantidades variaveis de DHA (Tabela 4).

TABELA 4

PROVA DE RECUPERAÇÃO

TUBO	EXTRATO *ml*	*DHA*	*D*		D_{520}/D_{420}	$D_{cor.}$	*DHA* ACHADO	RECUPERAÇÃO %
			520	420				
1	0.2	50	0.597	0.740	0.80	0.298	54	108
2	0.2	100	0.818	0.850	1.00	0.572	104	104
3	—	100	0.550	0.210	2.61	—	—	—

Como pode bem ser observado, a relação da absorção nos dois comprimentos de onda se eleva à medida que aumenta a quantidade de esteróide. A boa concordância dos resultados experimentais pode ser verificada na Fig. 3, onde estão assinalados os pontos experimentais correspondentes a 50 e 100µg de DHA, aderentes à curva teórica calculada.

O controle das condições particulares de cada reação foi feita pela introdução sistemática de um tubo controle com 100 µg de androsterona em cada lote de medidas. Só foram consideradas válidas as leituras quando o branco do sistema, lido contra água destilada a 520mµ, acusava valores abaixo de 0,2 para a densidade ótica; do mesmo modo, só foram usadas leituras em que a relação D_{520}/D_{420} para o padrão atingia valores acima de 2.0; quando tal não acontecia todo o sistêma era repetido, na maioria das vezes a causa estando em impurezas do alcool absoluto.

Com a finalidade de verificar a reprodutibilidade do método para a urina do cavalo, fizemos várias determinações com um mesmo extrato e

também várias determinações com diferentes extratos de urinas diferentes do mesmo animal. Alguns desses resultados, assinalados na (Tabela 5) mostram a perfeita concordância com os resultados que já haviamos obtido com urina humana.

TABELA 5

REPRODUTIBILIDADE DAS DETERMINAÇÕES

EXTRATO	17-CE mg/24 horas	
	DETERMINAÇÃO 1	DETERMINAÇÃO 2
G6-FN	16.8	17.0
G2-FN	70.0	72.0
G2-FC	59.0	54.0
G8-FC	47.5	41.5
G7-FC	15.0	13.0

Para aquilatar da validade das conclusões obtidas, os dados foram analisados pelo sistema de FISHER (1936) empregando-se o teste do "t", que já nos tem fornecido resultados satisfatórios em outros trabalhos com pequenas amostras. A comparação está condensada na Tabela 6. Empregamos o nível de significância de 5% para os valores de «t» (FISHER & YATES, 1948).

TABELA 6

ANALISE

CONDIÇÃO	FRAÇÃO	MÉDIAS $\bar{x}$	ERRO PADRÃO $S\bar{x}$	t P	t P_1	t P_2	t P_3
Normais	*FN*	37.2	7.7	2.12 > 0.05			
	FC	32.5	5.9		2.7 < 0.05		
Castrados	*FN*	19.9	2.2			1.43 > 0.05	
	FC	15.7	1.8				0.15 > 0.05

P = comparação *FN* normais x *FN* castrados
P_1 = comparação *FC* normais x *FC* castrados
P_2 = comparação *FN* x *FC* em castrados
P_3 = comparação *FN* x *FC* em normais.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \; ; \; s_p = \sqrt{\frac{S(x_1 - \bar{x}_1)^2 + S(x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Como se vê na tabela 6, não é significativa a diferença entre os resultados obtidos com as frações neutra e cetônica, nos dois grupos. Na comparação entre os resultados das frações cetônicas de normais e castrados o valor de "t" é ultrapassado para o nivel de 5% com 10 graus de liberdade; entretanto, a mesma comparação com os resultados da fração neutra não é significativo ao mesmo nível (escassamente, pois obtivemos 2.127 contra o valor tabelado de 2.228). Atentando para as condições particulares da fração neutra total, entretanto, acentuamos os resultados obtidos com as frações cetônicas resultantes da purificação com o reativo de Girard.

CONCLUSÕES

1. É válido o emprego das equações de côr para pigmentos e cromogênios inespecíficos na determinação dos 17-cetoesteróides neutros urinários do cavalo, quando se pratica a reação de Zimmermann com potassa alcoólica.

2. Os resultados obtidos com a FN total concordam com aqueles obtidos após fracionamento com o reativo "T" de Girard.

3. Os cavalos normais excretam significativamente maiores quantidades de 17-cetoesteróides neutros do que os cavalos castrados.

4. O testículo do cavalo parece contribuir, juntamente com outros orgãos (adrenal?), para a taxa de 17-cetoesteróides neutros urinários, como acontece em outras especies de mamíferos.

SUMMARY

Total urinary neutral 17-steroids were determined in normal and in castrated horses. One liter of a 15-26 hours urine collection was hydrolysed by refluxing with 10% HCl (v/v) for ten minutes and extracted with peroxyde-free ethyl ether. The extract was purified by washing with saturated $NaHCO^3$ and N KOH solutions. One half of the crude neutral fraction was fractionated with Girard's "T" reagent. The Zimmermann reaction was performed both in the ketonic and in the crude neutral extracts, using alcoholic 2.5N KOH and a 60 minutes period for the colour development in the dark. Optical density measuments were made in a grating Coleman Universal Spectrophotometer at 420 mμ and 520 mμ; for the crude neutral fraction a colour correction equation was applied. The aliquot fraction used for colorimety was adjusted for keeping optical density measurements within the range 0.2 to 0.7. Androsterone (mp. 184-184.5°C) with an absorption maximum at 290.5 mμ (Beckman Model DU Spectrophotometer) was used as a reference standard.

Table I, ilustrates the results obtained.

TABLE I

URINARY NEUTRAL 17-KETOSTEROIDS EXCRETION IN HORSES

ANIMAL	CONDITION	NEUTRAL 17 — KETOSTEROIDS mg/24 hours	
		NEUTRAL FRACTION	KETONIC FRACTION
C2	Castrated	10.5	10.4
C4	»	23.5	17.8
C5	»	23.3	15.5
C9	»	25.0	15.5
C10	»	20.3	23.4
C12	»	17.0	12.3
$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (*)		20.0 ± 2.2	15.7 ± 1.8
G2	Normal	70.0	54.6
G4	»	34.3	31.8
G5	»	31.8	33.0
G6	»	16.8	19.4
G7	»	23.5	15.0
G8	»	46.5	41.4
$\bar{x} \pm S\bar{x}$		37.2 ± 7.7	32.5 ± 6.0

(*) $\bar{x} = Sx/n$

$S\bar{x} = \sqrt{S(x - \bar{x})^2/n(n-1)}$

At the 0.05 probability level there is a significant difference among castrated and normal group means (Fisher's "t" test.) when were used the data obtained from the ketonic fractions; in spite of the use of a colour correction applied for inespecific chromogens, the same results could not be obtained with the crude neutral fractions. Since Girard's reagent fractionation is generaly accepted as the best method for correcting the inespecific chromogen interference in the determination of the 17-ketosteroids by the Zimmermann reaction, we emphasize the value of the results obtained with the ketonic fractions.

From these results it appears, as occurs in others mammals, that castrated horses show a lower level of urinary 17-ketosteroids excretion than the normal horses. The significance of the horse testis contribution for the neutral urinary steroid metabolites is discussed. Since horse urine has a low androgenic activity, the fractionation of the neutral 17-ketosteroids must be studied more accurately.

BIBLIOGRAFIA

1. Beall, D.

1940. The isolation of a-oestradiol and oestrone fom horse testes. *Biochem. J.*, **34**: 1293-1298.

2. Callow, N. H., Callow, R. K. & Emmen, C. L.

1938. Colorimetric determination of substances containing the grouping —CH_2CO— in urine extracts as an indication of androgen content. *Biochem. J.*, **32**: 1312-1331.

3. Cartland, G. F., Meyer, R. K., Miller, L. C. & Rutz, M. H.

1935. A comparison of theelin prepared from stallion urine, human urine, and from theelol, with notes on the colorimetric estimation of theelin and theelol. *J. Biol. Chem.*, **109** : 213-220.

4. Clark, L. C. Jr. & Kochakian, C. D.

1947. The "in vitro" metabolism of testoterone to Δ^4-androstenedione-3, 17, cis-Testosterone, and other steroids by rabbit liver slices. *J. Biol. Chem.*, **170** : 23-33.

5. Deulofeu, V. & Ferrari, J.

1934. Krystallisiertes α-Follikelhormon aus Hengstharn. *Z. physiol. Chem.*, **226** : 192-194.

6. Engstrom, W. W. & Mason, H. L.

1943. A study of the colorimetric assay of urinary 17-ketosteroids. *Endocrinol.*, **33** : 229-236.

7. Fisher, R. A.

1936. Statistical methods for research workers. Oliver & Boyd Ltd., London.

8. Fisher, R. A. & Yates, F.

1948. Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research. Oliver & Boyd, Ltd., London, 3ª. ed., VIII+112 pp.

9. Frazer, R. W., Forbes, A.P., Albright, A., Sulkowitch, H. & Reifenstein, E.C.Jr.

1941. Colorimetric assay of 17-ketosteroids in urine. *J. Clin. Endocrinol.*, **1** : 234-256.

10. Gibson, J. G. & Evelyn, K. A.

1938. Clinical studies of the blood volume. Adaptation of the method to the photoelectric microcolorimeter. *J. Clin., Invest.*, **17** : 153-158.

11. Girard, A. & Sandulesco, G.

1936. Sur une nouvelle série de reactifs du group carbonyle, leur utilization à l'extraction des substances cetonique et à la caracterization microchimique des aldehydes et cétones. *Helv. Chimica Acta*, **19** : 1095-1107.

12. Gustavson, R. G. in Allen, E. Danforth, C. H. & Doisy, E. A.

1939. Sex and Internal Secretions. 2d Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1346 pp.

13. Haussler, von E.P.

1934. Über das Vorkommen von α-Follikelhormon (3-oxy-17-keto-1,3,5-oestratriën) im Hengsturin.
Helv. Chimica Acta, **17** : 531-535.

14. Hogness, T. R., Sidwell, A. E. Jr. & Zscheile, P. Jr.

1937. The absorption spectra of compounds related to the sterols.
J. Biol. Chem., **120** : 239-256.

15. Holtorff, A. F. & Koch, F.C.

1940. The colorimetric estimation of 17-ketosteroids and their application to urine extracts.
J. Biol. Chem., **136** : 377-392.

16. Jensen, H., Lariviére, M. & Elie, J.J.

1945. The isolation of estrone sulfate from the urine of the stallions.
Rev. Canad. Biol., **4** : 535-537.

17. Koch, F.C.

1942. The excretion and metabolism of male sex hormones in health and disease.
Biol. Symposia, **9** : 41-63.

18. Kochakian, C. D., Parente, N. & Aposhian, A. V.

1949. Metabolism of testoterone and androstenediol 3(α), 17 (α) by liver and kidney homogenates.
Federation Proc., **8** : 214.

19. Levin, L.

1945. The isolation of α-estradiol from the urine of stallions.
J. Biol. Chem., **158** : 725-726.

20. Liebermann, S., Dobriner, K., Hill, B.R., Fieser, L.S. & Rhoads, C.P.

1948. Identification and caracterization of ketosteroids isolated from urine of healthy and diseased persons.
J. Biol. Chem., **172** : 263-295.

21. Marker, R.E. Wittle, E.L. & Lawson, E.J.

1938. Isolation of pregnanediols from bull's urine.
J. Amer. Chem. Soc., **60** : 2931-2933.

22. Mason, H.L. & Kepler, E.J.

1945. Isolation of androsterone, etiocholan-3(α)-ol,17-one and Δ^5-androsterone-3 (β), 17 (α)-diol from the urine after administration of dehydroisoandrosterone to a man.
J. Biol. Chem., **16** : 225-264.

23. Samuels, L.T.

1949. The metabolism of androgens by tissues.
Recent Progress in Hormone Research, **4** : 65-83.

24. Smith, H.P.

1930. Some problems in colorimetry. The quantitative analysis of mixtures of colored substances in solution.
J. Exp. Med., **51** : 369-378.

25. Tagman, E., Prelog, V. & Ruzicka, L.

1946. Untersuchungen über Organextrakt. Isolierung von Testosteron aus Testes des Pferdes.
Helv. Chimica Acta, **29**: 440-442.

26. Talbot, N. B., Berman, R.A. & Mac Lachlan, E.A.

1942. Elimination of errors in the colorimetric assay of neutral urinary 17-ketosteroids by means of a color-correction equation.
J. Biol. Chem., **143**: 211-218.

27. Vierordt., K.

1873. Die Anwendung des Spektralapparats zur Photometrie der Absorptionsspektren un zur quantitativen chemischen Analyse. In HEILMEYER-Spectrophotometry in Medicine. Adam Hilger, London.

28. Villgerodt, C.

1892. Zur Kenntniss des m-Dinitrobenzols.
Ber., **25**: 608-609.

29. Windaus, A.

1906. Notizen über cholesterin.
Ber., **39**: 518 523.

30. Zondek, B.

1934. Mass excretion of estrogenic hormone in the urine of the stallion.
Nature, **133**: 209-210.

31. Zondek, B.

1934. Estrogenic hormone in the urine of the stallion.
Nature, **133**: 494.

Hemograma do Coelho Normal e Mixomatoso

por

Alvaro Emery Trindade

I. HEMOGRAMA DO COELHO NORMAL

Pesquizando a bibliografia sôbre êste assunto a fim de ter uma tabela de valores normais, que já fôsse consagrada, tivemos o desprazer de verificar a disparidade dos dados publicados, conforme se pode ver nos quadros II e III, correspondentes aos valores encontrados para a leucometria e contagem específica, havendo, apenas, uniformidade nos valores correspondentes à hematimetria (quadro I).

Desta forma fomos obrigados a estabelecer os nossos próprios dados, ainda que em pequeno número de animais, para comparação com os números obtidos nos coelhos mixomatosos.

MÉTODO E MATERIAL

No nosso estudo visamos obter os dados relativos à hematimetria, à leucometria e à contagem específica, realizadas pelas técnicas usuais, em coelhos normais da criação do biotério do Instituto Oswaldo Cruz. As pipetas usadas eram de fabricação Arthur Thomas e a Câmara de contagem "Improved Neubauer" de Max Levy. Para as hematias e os leucócitos usamos respectivamente os líquidos de Hayem e de Thomas. As contagens e os esfregaços foram feitos com sangue retirado da veia marginal da orelha, sêcos imediatamente, e corados pelo May-Grunwald-Giemsa. Tôdas as coletas foram feitas pela manhã.

PARTE EXPERIMENTAL

Hematimetria

Trabalhamos com 20 coelhos realizando uma contagem em cada um, não nos tendo alongado mais, pela regularidade dos valores achados, cuja média aritmética simples foi igual a 5.186.000 de hematias por mm3., muito próximo do número encontrado pela maioria dos autores indicados no quadro I.

Leucometria

Para obtermos os números relativos à leucometria trabalhamos com 31 animais, em cada um colhendo material para uma contagem. Os valores máximo e mínimo foram respectivamente 14.500 e 5.900 leucócitos por mm3.,

sendo a média aritmética simples igual a 10.419 leucócitos por mm3. O quadro II apresenta uma coleção de dados encontrados na literatura sôbre o assunto.

Contagem específica

Fizemos 14 contagens específicas em diferentes coelhos normais, (quadro III) observando sempre a presença de uma linfocitose, que chega a atingir 50% das células, bem como uma eosinofilia dos neutrófilos, já bastante conhecida, sendo por esta razão chamados de pseudo-eosinófilos por uns, e heterófilos por outros. Interessante é ainda, a confirmação do achado de AGOSIN no Chile, da presença de células morfològicamente semelhantes às de TUERK, no sangue circulante do coelho normal, sendo o nosso valor para esta célula muito mais alto do que o do citado autor. Quanto aos eosinófilos propriamente ditos, os diversos valores encontrados na literatura estão acima dos nossos. Quanto aos basófilos e aos monócitos os valores são assás discordantes entre os autores consultados.

E' possível que muitos fatores possam influenciar estas variações tais como raça, clima e alimentação, estando porém afastadas as hipóteses de variação devido a idade e temperatura (AGOSIN, KELLUM e FORKNER, e PEARCE e GASEY).

QUADRO I

Dados colhidos sôbre a Hematimetria

Burnett (1908)	5.500.000
Goodall (1910) (valor médio)	5.160.000
Mole (1925)	5.567.609
Pearce & Casey (1930)	5.198.000
Sjovall (1930) (valor médio)	5.250.000
Agosin (1948)	5.102.000

QUADRO II

Dados da literatura para os leucócitos

Ewing (1895)	7.920
Muir (1910)	7.537
Brinckenhoff & Tyzzer (1902)	9.318
Bunting (1906)	9.216
Webb, Williams & Basinger (1910)	9.800
Goodall (1910)	10.500
Moss & Brown (1911)	7.646
Muir (1912)	6.785
Jones (1912)	6.520
Orr (1917)	8.246
Zinsser & Tsen (1917)	11.120
Wells (1917)	10.760
Rogers (1920)	10.366
Down & Eddy (1920)	10.360
Kellum & Forkner (1923)	7.920
Scott & Simon (1924)	11.505
Cunningham et al (1925)	11.281
Bushnell & Bangs (1926)	10.675
Reifenstein, Ferguson & Weiskotten (1941)	9.942
Haymes & Rigdom (1942)	10.662
Agosin (1948)	6.600

QUADRO III

Dados sôbre a contagem específica

	Het.	Baso	Eosi	Mono	Linf.	Turk
Kellum & Forkner (1923)	39,9	7.8	1.7	6.2	46.5	—
Pearce & Casey (1930)	46	9	2	10	33	—
Down & Eddy (1920)	40 a 50	4 a 8	0.5 al	2 a 8	45 a 55	—
Agosin (1948)	49.73	1.11	0.79	1.71	46.22	0.08
Goodall (1910)	43	2.5	2.5	—	52	—
Emery Trindade	40	2.5	0.2	6.5	50	0.8

DADOS ESTATÍSTICOS

	Leucócitos	*Hematias*
N.º de casos	31	14
média	10.419	5.186.000
D S	2.509	994.910
t	4.15	5.21

AGRADECIMENTO

Agradecemos o auxílio prestado pelo Dr. Pedro Fontana no tratamento estatístico dos dados.

SUMÁRIO

O autor procurou estabelecer ós dados relativos ao hemograma de coelho normal, do Biotério do Instituto Oswaldo Cruz, encontrando as seguintes médias: hematias 5.186.000 por mm3, leucócito 10.419 por mm3, e na contagem específica os seguintes valores para Heterófilos 40%, basófilos 2.5%, eosinófilos 0.2%, monócitos 6.5% e linfócitos 50%, e células de Tuerk 0.8%. Pode o autor confirmar o achado de Agosin, referente à presença de células morfológicamente semelhantes às de Tuerk, no sangue periférico dos coelhos normais. Realizou ainda, uma revisão bibliográfica do assunto.

BIBLIOGRAFIA

Agosin, M. K.
1946. Biologica, **5**, 53.

Brinckerhoff, W. R. & Tyzzer, E. E.
1902. J. Med. Res. **7**, 173.

Bunting, C. H.
1906. J. Exper. Med., **8, 625.**

Bushnell, L. D. & Bangs, E. F.
1926. J. Infect. Dis., **39**, 291.

Cheng, S. C.
1930. Am. J. Hyg., **11**, 449.

Downs, A. W. & Eddy, N. B.
1920. Am. J. Physiol., **51**, 279.

Goodall, A.
1910. J. Path. & Bact., **14** 195.

Haymes, A. & Rigdon, R. H.
1942. The Anatomical Record, **83**, 587.

Kellum, E. & Forkner, C. E.
1923. The Anatomical Record, **25**, 109.

Moss, W. L. & Brown, G. L.
1911. John Hopkins Hosp. Bull., **22**, 258.

Muir
1901. J. Path. & Bact., **7**, 161.

Orr, T. G.
1916-17. J. Lab. & Clin. Med., **2**, 895.

Pearce, L. & Casey, A. E.
1930. J. Exper. Med., **51**, 83.

TRANSLATION

Blood Counting of Normal and Mixomatous Rabbits

1. BLOOD COUNTING OF NORMAL RABBITS

On a bibliographic research on this subject to obtain a table for normal values already accepted, we unfortunately found a great disparity in published works, as can be seen in tables II and III, which correspond, respectively, to values found for white blood cells counting and shillings counting. We found uniformity only on values for red blood cells counting (table I). For this reason we were obliged to establish our own data, although based on a small number of animals, to compare with the values obtained in mixomatous rabbits.

METHOD AND MATERIAL

In our study we tried to obtain data on red blood cells counting, white blood cells counting and shillings counting, performing the usual technique in normal rabbits from the Bioterio of Instituto Oswaldo Cruz. We used Arthur Thomas' pipets and Max Levy's "Improved Neubauer" counting chamber. For red and white blood cells dillution we used, respectively, Hayem and Thomas liquours. Countings and smears were made with blood taken from the rabbits' ear marginal vein, dried immediately and stained by May-Grunwald-Giemsa's method. All samples were taken in the morning.

EXPERIMENTAL PART

a) Red Blood Counting.

We worked with 20 rabbits performing in each one counting. We did not go further, due to the regularity of the values found, the simple arithmetical mean of which was equal to 1,181,000 red blood cells per cu. milimeter, close enough to the numbers found by the majority of authors indicated in table I.

b) White Blood Counting.

To obtain values for white blood counting we worked with 31 animals, taking from each material for one counting. The maximum and minimum values were, respectively, 14,500 and 5,900 white blood cells per cu. milimeter, with a simple arithmetical mean equal to 10,419 white blood cells per cu. milimeter. Table II shows a collection of data found in the pertinent literature.

c) Shilling counting.

We performed 14 Shilling's countings in different normal rabbits, (Table III), observing, always the presence of a lymphocitosis, which reached fifty per cent of cells, as well as eosinophilex of neutrophiles, already known, being these for this reason called heterophiles by some and pseudo-eosinophiles by others. It is interesting to confirm Agosin's discovery, in Chile, of presence of cells morphologically similar to Tuerk's, in the circulating blood of normal rabbits. Our value for this cell, however, is much greater than Agosin's. As for eosinophiles proper, the values found in the literature are above ours. For basophiles and monocites, the values are very discordant among the various papers read.

It is possible that many factors can influence these variations, as breed, climate and food, but temperature and age are definitely discarded as hypothesis for variation (Agosin, Kellum & Forkner and Pearce & Casey). The present paper was elaborated in spring, at a medium temperature varying from 24 to 28° C.

TABLE I

Data collected on red blood cells counting

Burnett (1908)	5,500,000
Goodall (1910) (valor médio)	5.160,000
Mole (1925)	5,657,609
Pearce & Casey (1930)	5,198,000
Sjovall (1930) (valor médio)	5,250,000
Agosin (1948)	5,102,000

TABLE II

Data on white blood cells counting found in the literature

Ewing (1895)	7,920
Muir (1910)	7,537
Brinckenhoff & Tyzzer (1902)	9,318
Bunting (1906)	9,216
Webb, Williams & Basinger (1910)	9,800
Goodall (1910)	10,500
Moss & Brown (1911)	7,646
Muir (1912)	6,785
Jones (1912)	6,520
Orr (1917)	8,246
Zinsser & Tsen (1917)	11,120
Wells (1917)	10,760
Rogers (1920)	10,366
Down & Eddy (1920)	10,360
Kellum & Forkner (1923)	7,920
Scott & Simon (1924)	11,505
Cunningham et al (1925)	11,281
Bushnell & Bangs (1926)	10,675
Reifenstein, Ferguson & Weiskotten (1941)	9,942
Haymes & Rigdom (1942)	10,662
Agosin (1948)	6,600

TABLE III

Data on Shilling's Counting

	Het.	Baso	Eosi	Mono	Linp.	Tuerk
Kellum & Forkner (1923)	37,9	7,8	1.7	6.2	46.5	—
Pearce & Casey (1930)	46	9	2	10	33	—
Down & Eddy (1920)	40to50	4to8	0.5to1	2to8	45to55	—
Agosin (1948)	49.73	1.11	0.79	1.71	46.22	0.08
Goodall (1910)	43	2.5	2.5	—	52	—
Emery Trindade	40	2.5	0.2	6.5	50	0.8

STATISTICAL DATA

	White blood cells	Red blood cells
Number of cases	31	14
Media	10.419	5.186.000
SD	2.509	994.910
t	4.15	5.21

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. Pedro Fontana's help in the Statistical treatment of data.

SUMMARY

The author has established data on blood counting of normal rabbits, from the Bioterio of Instituto Oswaldo Cruz, having found the following averages: red blood cells 5,186,000 per cu. milimeter; white blood cells, 10,419 per cu. milimeter. For shilling's counting, the following values: Heterophiles, 40%; basophiles, 2,5%; eosinophiles, 0,2%; monocites, 6,5%; lymphocites 50% and Tuerk's cells, 0,8%. The author confirms Agosin's discovery on the presence of cells morphologically similar to Tuerk's in peripheric blood of normal rabbits. Has done, also, a bibliographical research on this subject.

BIBLIOGRAPHY

Please turn back to end of Portuguese text.

Ação Bacteriolítica dos Fosfatos (Fosfatólise Bacteriana)

Genesio Pacheco e Vinicius Moreira Dias

Anteriormente Pacheco e Abreu (3) observaram um efeito lítico de uma água mineral radioativa sôbre certas bactérias e Pacheco & Echaniz (4) compararam a atividade bacteriolítica do $Na_2 HPO_4 . 2H_2O$ sôbre *Salmonella typhosa* e *Escherichia coli.*

No presente trabalho procurou-se observar as possíveis diferenças na atividade de vários fosfatos.

MATERIAL E MÉTODO

Os sais usados foram $Na_2HPO_4 . H_2O$, $Na_2 HPO_4 . 2H_2O$, $Na_3 HPO_4 . 12H_2O$ e $K_2 HPO_4 . H_2O$, em soluções M/10, M/50, D/100, M/500, M/1000 ou 1/100 e 1/1000.

Os germens usados foram a *S. typhosa* amostra H901, *E. coli* e *Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* de nossa coleção de culturas. Germens crescidos em agar inclinado, durante 24 horas, eram suspensos e lavados 2 vezes em águas fisiológica, depois preparadas suspensões de modo a obter concentrações adequadas.

As soluções de fosfato eram distribuidas em tubos Kimble de 13x100/mm, apropriados ao colorímetro fotoelétrico de Klett- Summerson. A concenleitura aproximada de 100 ou mais do colorímetro, usando o filtro verde lisadas todos os dias e os resultados referidos à leitura inicial com aumento (540mμ), utilisando a solução fosfatada como *blank*. As leituras eram realisadas todos os dias e os resultados referidos à leitura inicial com aumento ou decréscimo da opacidade. Mantinham-se os tubos com as suspensões na temperatura ambiente e no final verificava-se a viabilidade dos germens. De outras vezes os germens eram prëviamente mortos e conservados em tubos fechados a lampada.

RESULTADOS

Mostraram as experiências com $Na_2 HPO_4 . 2H_2O$ 1/100 e 1/1000, com *M. pyogenes* e *E. coli* que êste sal exercia nítida ação bacteriolítica sôbre o *M. piogenes* nas concentrações usadas, quer nos tubos fechados quer nos abertos, na temperatura ambiente ou a 39º, vivos ou mortos (pelo eter), Figs. 1 e 2. Sôbre a *E. coli* a atividade foi menos intensa. Figs. 3 e 4.

Com $NaH_2 PO_4 . H_2O$ em várias concentrações o efeito variou com os diferentes germens utilisados: a *S. typhosa* foi lisada em todas concentrações usadas, embora menos que na agua destilada (Fig. 5); a *E. coli foi* lisada

mais intensamente na solução 1/100 e 1/1000 e menos nas outras concentrações (Fig. 6). *M. pyogenes* se mostrou lisado no mesmo grau que na água destilada (Fig. 7). Em outras experiências preliminares, no entanto, as concentrações mais fracas se mostraram mais bacteriolíticas.

O pH das soluções medido com eletrode de vidro foi: M/10, 4.5; M/50, 4.75; M/100, 4.92; M/500, 5.07; M/1000, 5.32.

Com $Na_3 HPO_4$, H_2O, os resultados foram um tanto diferentes dos alcançados com o $NaH_2 PO_4$. H_2O: a *S. typhosa* foi menos lisada que na água destilada, tal qual foi obtido com o $NaH_2 PO_4$. H_2O (Fig. 8); a *E. coli*, entretanto foi fortemente lisada em tôdas as concentrações, sendo mais ativas as mais concentradas; *M. pyogenes* foi totalmente lisado em solução M/100 e M/1000 (Fig. 10). O pH destas soluções foi: M/10, 11,4; M/50, 11.5; M/100, 11.35; M/500, 9.6; M/1000, 7.43.

Anteriormente vimos que os microrganismos mortos eram intensamente lisados em presença de solução de $Na_2 HPO_4$. $2H_2O$. Por isso empregamos 3 tipos de fosfatos em solução M10 e M/100 (Fig. 11-12-13). Os microrganismos eram mortos pelo eter que era evaporado durante uma noite na estufa e em seguida suspensos nas soluções de fosfatos. Os germens vivos eram suspensos em água destilada para comparação (Fig. 14).

DISCUSSÃO

Lise de bactérias pode resultar de anticorpos, envelhecimento, morte, bem como de agentes químicos. De qualquer modo a lise resulta sempre da ruptura da parede celular.

A primeira observação da lise bacteriana pelos fosfatos foi de Evangelinos & Wohlfeil (1) com a *E. coli*. Mediram êles a lise pelo acréscimo do teor de proteinas dos filtrados das suspensões bacterianas em soluções de fosfato de sódio M/15, M/30 e M/6$, tendo se revelado ativas tôdas elas. O *Proteus* foi menos lisado nas concentrações mais fracas. A lise foi vista mais forte em temperatura entre 37-45°.

Welsch, Salmon & Heusghen (9) observaram que a lise expontânea do estafilococo pela "estafilolisina" era incrementada com a adição de fosfato de potássio 0,1 por cento. Removendo o fosfato pelo carbonato de bário a lise permanecia.

Welsch & Salmon (8) viram ainda que o fosfato dispotássico ativara líquidos inativos ou pouco ativos, pela excessiva diluição, sendo o fosfato monopotássico menos ativo. Bactérias mortas foram lisadas como as vivas, revelando que o fenômeno deve ser diferente do referido por Welsch.

Welsch & Salmon (8) verificaram que suspensões de estafilococos lavadas 3 vezes quase não eram lisadas mas que a junção de 0.1 por cento de fosfato dissódico determina rápida lise o que interpretaram como um efeito ativo do fosfato sôbre o princípio lítico (ou fermento) que se revelou necessário à bacteriólise. Por outro lado o lavamento bacteriano reduz enormemente a ação lítica do seu «fermento», que pode ser reativado pelo fosfato, como quer Welsch (7).

Os trabalhos de Welsch e seus colaboradores admitem a existência de uma bacteriolisina a qual pode ser inespecífica segundo Smolier (5) ou específica como quer Welsch (7).

Nossos resultados mostraram uma atividade bacteriolítica de vários fosfatos, algumas vezes bastante intensa. As observações de WELSCH & SALMON (8) de lise expontânea foram feitos com líquidos contendo fosfatos, salvo quando êste foi eliminado por tratamento químico mas póde ter havido uma penetração intracelular prévia do fosfato antes da sua eliminação do líquido que o continha.

Nossas observações acêrca da ação lítica dos fosfatos em diluições fracas, parece-nos de importância, pois observa-se algumas vezes o desaparecimento de germens nas culturas em caldo que contenha fosfatos. Observaram MELLO & COL., (2) por exemplo, rápido desaparecimento de brucelas em meios contendo fosfatos como tampão.

Certos cocos Gram positivos são particularmente sensíveis à fosfatolise e é frequente a observação de seu desaparecimento nas hemoculturas em meios líquidos.

RESUMO

1) As bactérias são lisadas pelos fosfatos, cuja atividade lítica varia com o sal de fosfato, os trivalentes sendo mais ativos.

2) A fosfatólise independente da viabilidade da bactéria.

3) A fosfatólise póde interferir nas suspensões com tampões de fosfatos e na preservação de hemoculturas.

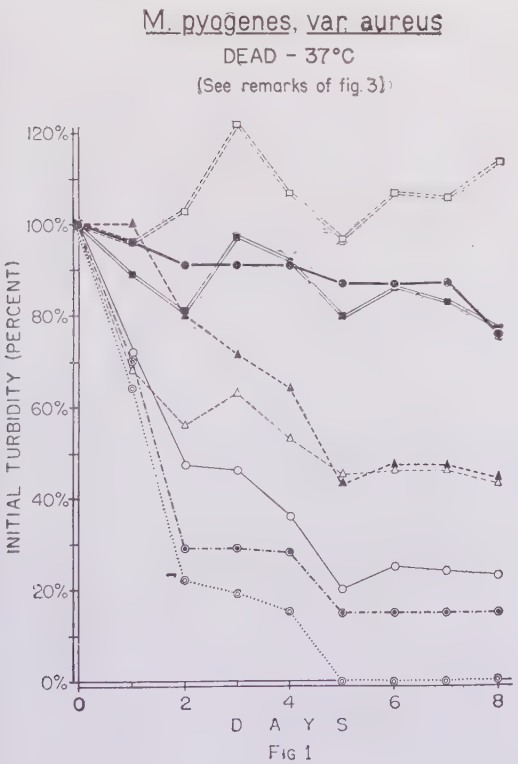


FIG 1

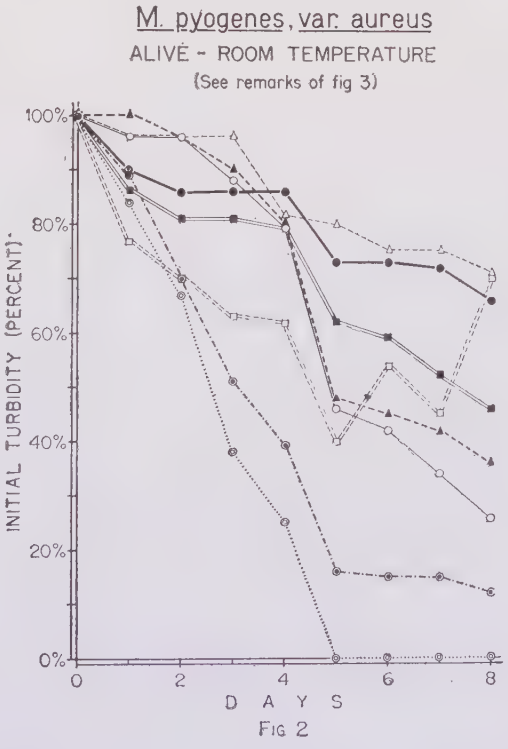


FIG 2

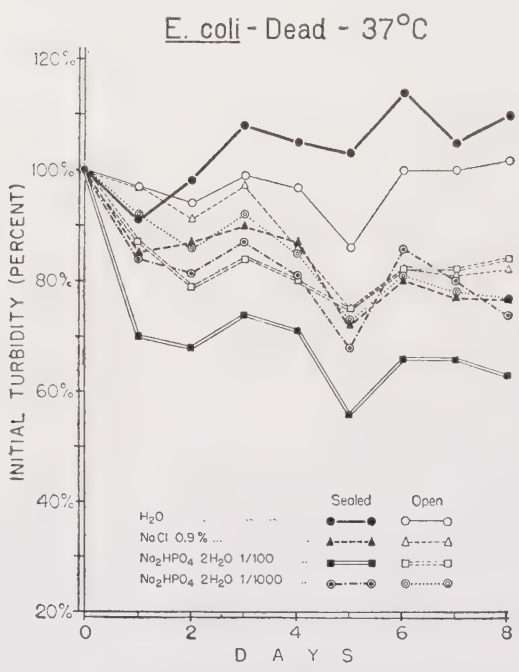


FIG 3

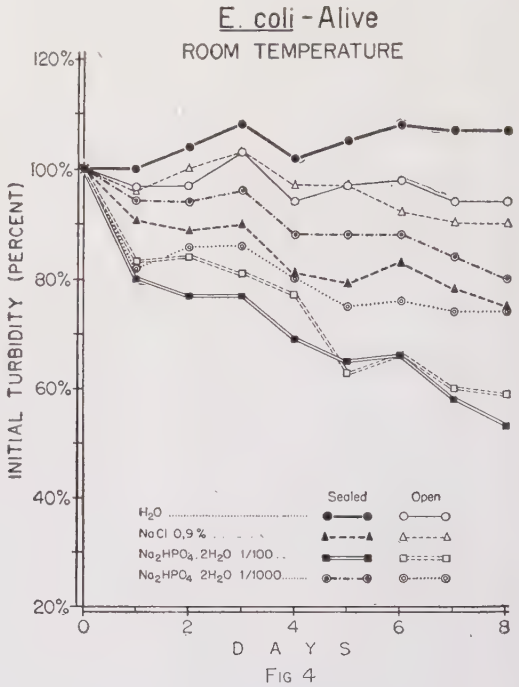


FIG 4

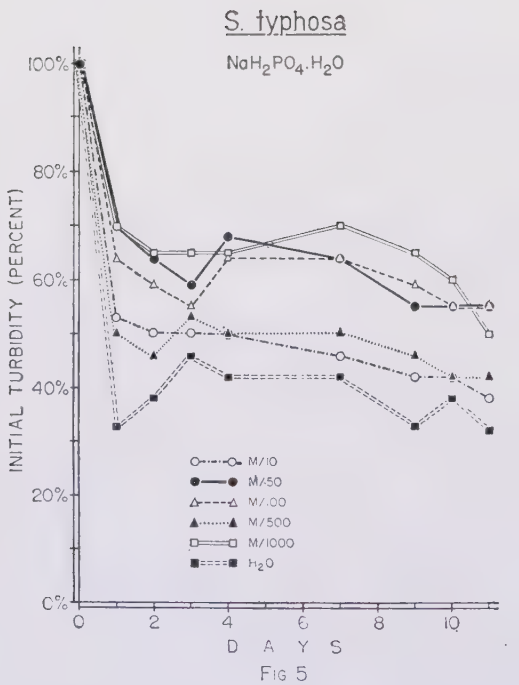


FIG 5

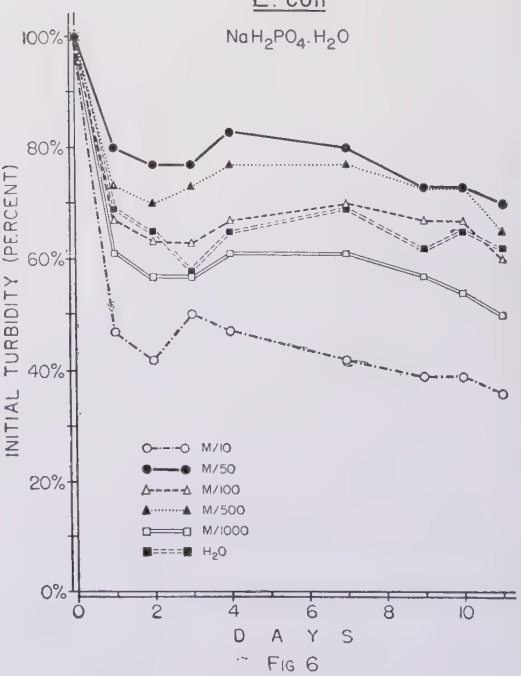


FIG 6

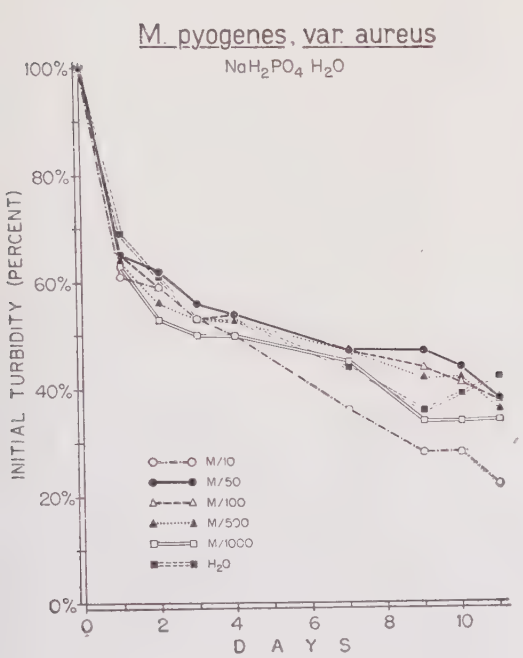


FIG. 7

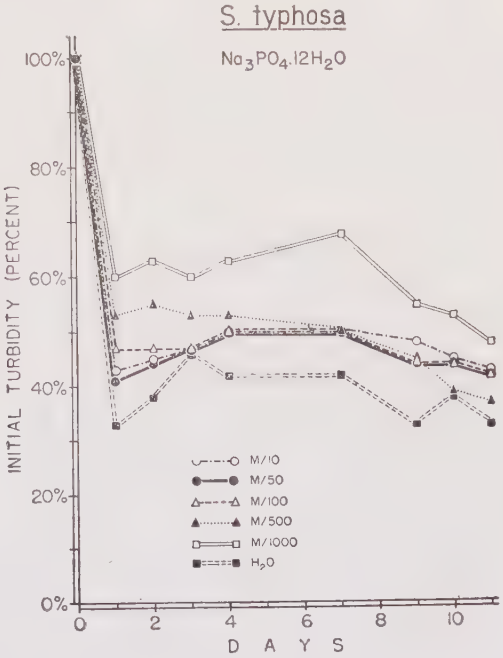


FIG. 8

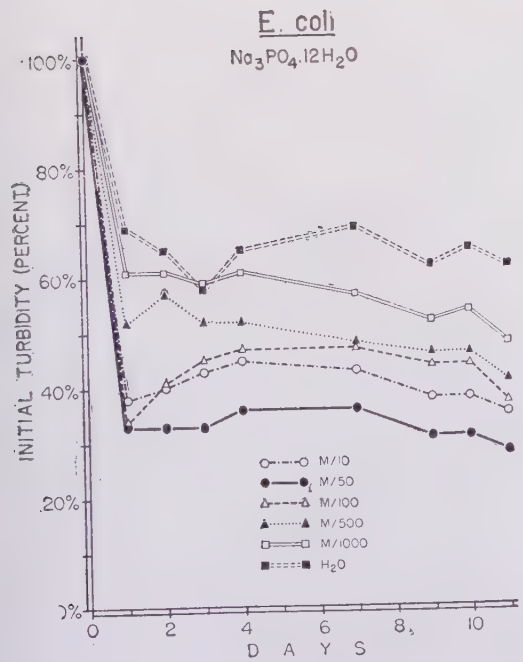


FIG. 9

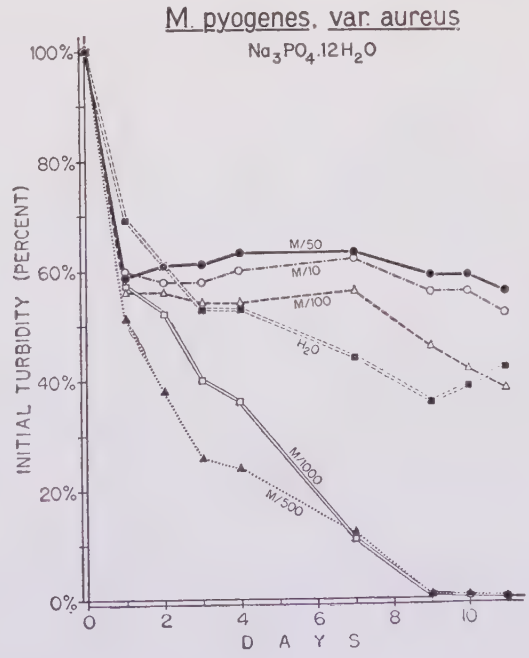


FIG 10

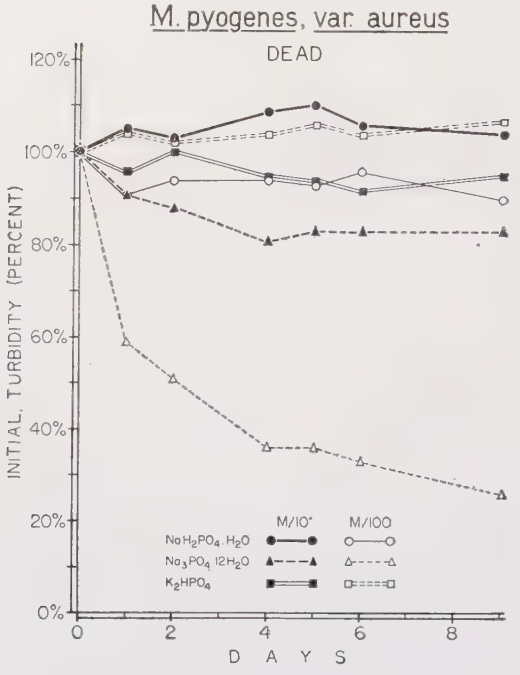


Fig. 11

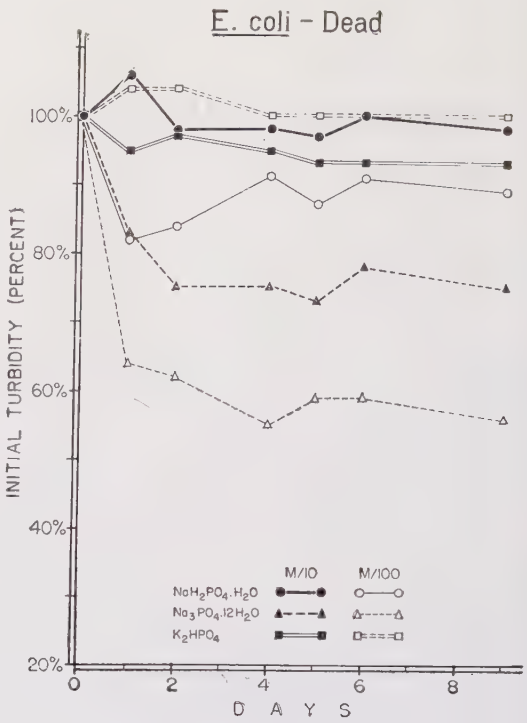


Fig. 12

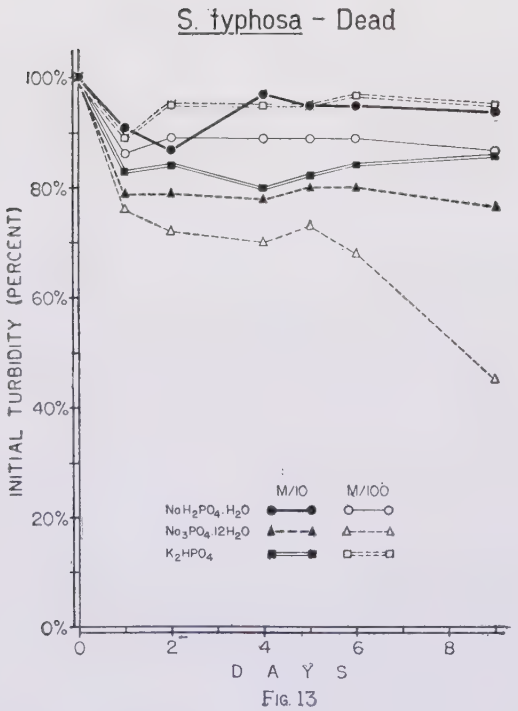


Fig. 13

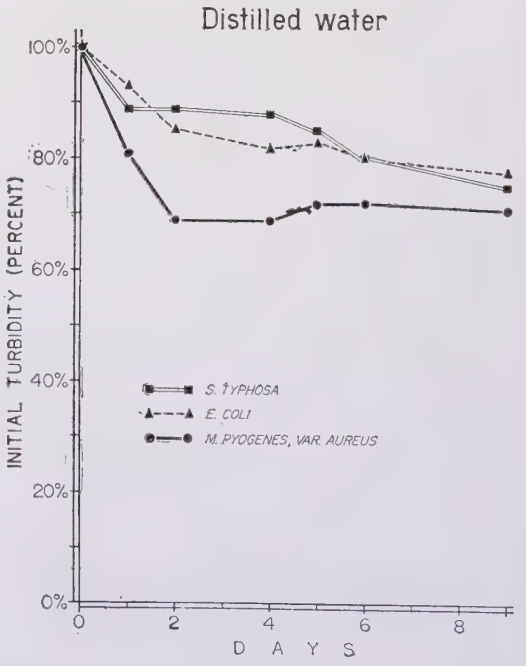


Fig. 14

TRANSLATION

Bacteriolytic Action of Phosphates

(Bacterial Phosphatolysis)

In previous papers PACHECO and ABREU (1949) reported the lytic action of phosphates on certain bacteria, and PACHECO and ECHÃNIZ (1953) described the lytic and bactericidal activity of $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ on *Salmonella typhosa and Escherichia coli*.

In the present paper some experiments conducted in order to observe a possible difference in the bacteriolytic action of phosphates are described.

MATERIAL AND METHODS

The salts used were $NaH_2PO_4 . H_2O$. $Na_2HPO_4 . 2H_2O$. $Na_3PO_4 . 12H_2O$ and $K_2HPO_4 . H_2O$, in M/10, M/50, M/100, M/500 and M/1000 or 1:100 and 1:1000 solutions.

The microorganisms used were *S. typhosa* H901, *E. coli and Micrococus pyogenes,* var. *aureus,* all from our culture collection. They were grown during 24 hours on agar slants and washed twice in distilled water. Only some drops of a concentrated suspension were needed to obtain in the phosphate solutions an adequate concentration.

The salt solutions were dispensed in 13 x 100 mm Kimble test tubes matched for use in a Klett-Summerson photoelectric colorimeter. To the solutions the concentrated suspension of the microorganisms to be tested was added. The final suspension thus obtained gave a direct reading of 100 or a little more in the Klett-Summerson colorimeter equipped with a green filter (540 mμ) and using the pure solution of phosphate as the blank. The readings in the colorimeter were made almost daily and the results recorded in percent of the initial readings (increasing or decreasing of the opacity).

The tubes were maintained at room temperature and the microorganisms were found to be alive unless otherwise stated. Otherwise the microorganisms were killed, or the tubes weere sealed in certain experiments.

RESULTS

Experiments using $Na_2HP0_4 . 2H_20$ in 1:100 and 1:1000 dilutions and *M. pyogenes* and *E. coli* as test organisms showed that this salt was very active as a lytic agent against *M. pyogenes* in the various conditions tested: sealed and open tubes, 37°C and room temperature, alive and dead microorganisms (killed with ether) (Figs. 1 and 2). Against *E. coli,* in the same conditions its activity was less intense (Figs. 3 and 4).

Tests with $NaH_2PO_4 . H_2O$ in various solutions showed different results according to the microorganism employed: *S. typhosa* was lysed in all concentrations tested but in a lower intensity than with distilled water (Fig. 5); *E. coli* was more intensely lysed in presence of M/10 and M/1000 concentrations but less in other concentrations used (Fig. 6); *M. pyogenes* was lysed almost in the same grade as in presence of distilled water (Fig. 7).

In other preliminary experiments, however, the lower concentration (M/1000) was more active than the stronger concentrations.

The pH of the solutions (measured with glass electrode) were the following: M/10, 4.5; M/50, 4.75; M/100, 4.92; M/500, 5.07; M/1000, 5.32.

With Na_3PO_4. $12H_2O$ the results were somewhat different than those obtained with $NaH_2PO_4.H_2O$: *S. typhosa* was lysed a little less than with distilled water, as occurred with NaH_2PO_4. H_2O (Fig. 8); *E. coli*, however, was intensively lysed in all concentrations, the highest concentrations being more active (Fig. 9); *M. pyogenes* var. *aureus* was completely lysed in presence of M/500 and M/1000 concentrations (Fig. 10). The pH of those solutions were the following: M/10, 11.4; M/50, 11.5; M/100, 11.35; M/500, 9.6; M/1000, 7.43.

In preliminary experiments it was observed that dead microorganisms were readily lysed in presence of Na_2HPO_4. $2H_2O$. Then three phosphates were tested, in M/10 and M/100 concentrations (Fig. 11, 12, 13); the three species of microorganisms were suspended in the phosphates after they have been killed with ether (evaporated overnight in an incubator). In the experiment, alive microorganisms were tested in the presence of distilled water (Fig. 14). The results showed that Na_3PO_4. $12H_2O$ in M/100 concentration was the most active lytic solution.

DISCUSSION

Bacterial lysis may be produced by the action of antibodies, ageing and death of microorganisms as well as chemical or physical agents. The mechanism of lysis, however, is always represented by rupture of the cell wall.

The first observation of bacterial lysis by phosphates was made by Evangelinos and Wohlfeil (1939) with *E. coli*. They measured the lysis by the increase of the proteic content of filtrates of suspensions of the microorganisms in M/15, M/30 and M/60 sodium phosphate. All these concentrations were active. Proteus bacilli were more lysed in the presence of lowest concentrations. The lysis was more intense in temperature ranging from 37°C to 45°C.

Welsch, Salmon and Heusghem (1949) observed that spontaneous lysis of staphylococci determined by a "staphylolysine" was increased by the addition of 0.1 per cent potassium phosphate. When all the phosphates were removed from the broth with calcium or barium carbonate the lysis also occured.

Welsch and Salmon (1949) observed also that K_2HPO_4 activated fluids completely inactive or less active due to excessive dilution. In the case of KH_2PO_4 the activity was lower in the same circunstances. Dead bacteria were lysed like the alive, showing that the fenomenon is different from that observed by Welsch (1949).

Welsch and Salmon observed yet that staphylococci suspensions washed three times were almost not lysed, but the addition of 0.1 per cent K_2HPO_4 determined a rapid lysis which they accounted for an activation of the lytic principle ("ferment") by the phosphate, which became needed

for the bacteriolysis by its "bacteriolytic" ferment. In other side the washing of the bacterial suspension reduced enormously the lytic action of its ferment, "reactivated" by phosphate addittion, as refered by Welsch.

The work of Welsch and his coworkers admits the existence of a bacteriolysine which may be inespecific acording to Smolier (1949) or specific as admitted by Welsch (1949).

Our results show that phosphates have a lytic activity which is sometimes very intense. Welsch and Salmon observed the influence of phosphates upon spontaneous bacterial lysis but the fluid in which the microorganisms were suspended always contained phosphates, except in the work reported with Salmon and Heusghem, when they intended to have eliminated the phosphates from the medium, but it is possible a previous intracelular ingress of fosfates before its elimination.

Our observations of bacterial lysis in presence of small amounts of certain phosphates seem to be of importance because it is a common observation that bacterial lysis occurs in ageing of broth cultures and it is known that liquid media have always a certain amount of phosphates. Mello and coworkers (1951) observed, also, the rapid decrease of the number of *Brucella* when microorganisms were suspended in phosphate buffer. Certain Gram positive cocci are very sensitive to the lysis and it is common to observe their disappearence in blood cultures in liquid media.

SUMMARY

Bacteria are lysed by phosphates in low concentrations. Differences were observed in the lytic activity according to the salt, the trivalent salt being the more active. The lytic action is not always dependent of the living or dead state of the microorganisms. It seems that this "bacterial phosphatolysis" is of importance for the preservation of microorganisms in culture media or in a simple solution containing phosphates.

BIBLIOGRAPHY

1) Evangelinos, P. and Wohlfeil, T. W.

1939. Ueber Bakterien autolyse und deren Bedeutung fuer Bakterieller Impfstoffe. Zenth. f. Baút., **144**: 129-135.

2) Mello, G. C., Danielson, I. S. and Kiser, J. S.

1951. The toxic efect of buffered saline solutions on the viability of *Brucella abortus*. J. Lab. Clin. Med. **37** : 579-583.

3) Pacheco, G. and Abreu, M. A.

1949. Ação de uma água radioativa sôbre enterobactérias. Presented before the Congresso Medico do Brasil Central e do Triangulo Mineiro. To be published.

4) Pacheco, G. and Echañiz, J. S.

1956. Ação bactericida e bacteriolítica dos fosfatos. — Brasil Médico, 67: 43-46.

5) Smolier, V.

1949. Nouveaux aspects des activités bactériolytiques et bactéricides des Actinomyces. Compt. Rend. Soc. Biol., **143** : 1147-1150.

6) WELSCH, M.

1956. Ação bactericida e bacteriolítica dos fosfatos. — Brasil Médico, **67**: 43-46. Biol., **143**: 997-999.

7) WELSCH, M.

1949. A propos de l'autolyse du Staphilocoue. Compt. Rend. Soc. Biol. **143**: 719-920.

8) WELSCH, M., SALMON J.

1949. Sels derivés du phosphore et activité bacteriolytique du Staphylocoque. Compt. Rend. Soc. Biol., **143**: 1399-1401.

9) WELSCH, M., SALMON J. and HEUSGHEM C.

1949. Importance des phosphates par les activités bactériolytiques du Staphylocoque. Compt. Rend. Soc. Biol., **143**: 1152-1154.

Nova Espécie do Gênero "Aplectana" Railliet & Henry, 1916 (Nematoda, Cosmocercidae)

A. A. Jorge da Silva

(Com 5 figuras no texto)

Pelo Dr. Hugo de Souza Lopes, Professor Catedrático de Zoologia Médica e Parasitologia da Escola Nacional de Veterinária, fomos convidados a nos especializar na Seção de Helmintologia do Instituto Oswaldo Cruz, onde, sob orientação do Dr. João Ferreira Teixeira de Freitas, fizemos os estudos necessários à presente publicação.

Entre os mêses de maio a agôsto de 1953 autopsiamos 16 pererécas capturadas nos prédios da Universidade Rural; alguns exemplares remetidos ao Sr. Werner Bockermann do Departamento de Zoologia da Secretaria de Agricultura de São Paulo (Museu Paulista de Zoologia), foram por êle determinados como *Hyla fuscovaria* Lutz. Em duas dessas pererécas encontramos 1 macho e 3 fêmeas de uma espécie nova do gênero *Aplectana*, agora descrita :

Aplectana lopesi sp. n.

Comprimento — Macho 3,28 mm.; fêmeas 10,21 a 11,05 mm.

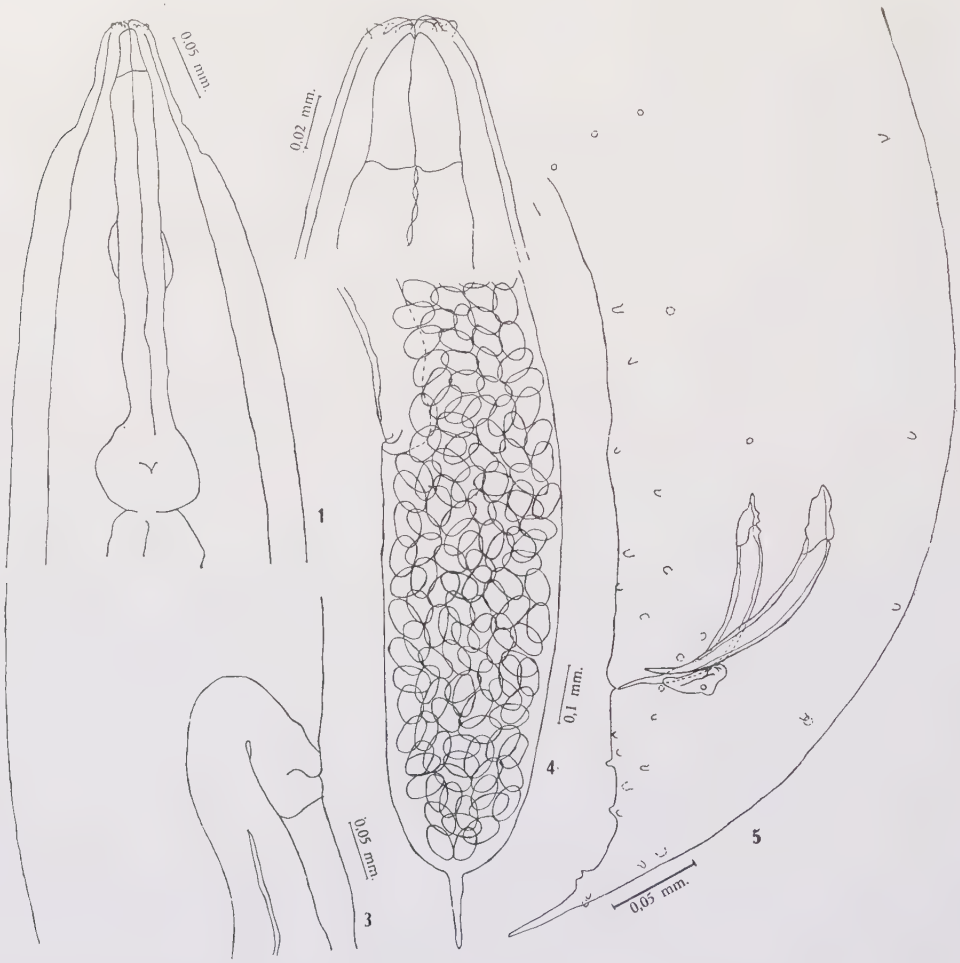
Largura — Macho 0,20 mm.; fêmeas 0,21 a 0,23 mm.

Corpo com cutícula estriada longitudinalmente e com asas laterais que se estendem pelo têrço anterior do corpo. Boca com 3 lábios pequenos. Esôfago possuindo faringe e bulbo; mede, sem o bulbo, 0,29 mm. de comprimento no macho e 0,45 a 0,46 mm. nas fêmeas. Bulbo com 0,076 mm. de diâmetro no macho e 0,088 mm. nas fêmeas. Anel nervoso situado a 0,168 mm. da extremidade anterior no macho e a 0,269 a 0,277 mm. nas fêmeas. Poro excretor distando 0,319 mm. da extremidade anterior no macho e 0,407 a 0,426 mm. nas fêmeas.

Fêmeas prodelfas, com vulva situada a 3,3 a 3,8 mm. da extremidade anterior. Ovejetor bastante musculoso, dirigindo-se para diante e depois, para trás, com vestíbulo simples. Úteros descendente e ascendente com ovos embrionados que medem 0,080 mm. de comprimento por 0,046 mm. de largura. Abertura anal situada a 0,83 mm. da ponta da cauda. Extremidade posterior atenuada em flagelo terminal que mede 0,109 a 0,113 mm. de comprimento.

Macho com espículos bem quitinisados, medindo 0,15 mm. de comprimento por 0,011 mm. de largura média. Gubernáculo bem quitinisado, com 0,034 mm. de comprimento por 0,013 mm. de largura. Anus situado

a 0,155 mm. da ponta da cauda. Cauda cônica e aguda, levemente curvada ventralmente. Papilas caudais pequenas, assim distribuidas : 7 pares pos-



Aplectana lopesi sp. n. — Fig. 1 : Extremidade anterior do macho ; fig. 2 : extremidade cefálica da fêmea alótipo; fig. 3: vulva e ovejetor (alótipo); fig. 4: extremidade posterior da fêmea alótipo : fig. 5: cauda do macho, vista lateral.

anais, sendo 5 ventrais e 2 dorsais; 3 pares ad-anais, dos quais 1 é sub-dorsal e 2 laterais, e, aproximadamente, 18 pares pré-anais, além de algumas papilas situadas sub-dorsalmente, de modo irregular.

Habitat — Intestino grosso de *Hyla fuscovaria* Lutz.

Proveniência — Universidade Rural, Km. 47 da Rodovia Rio-S. Paulo, Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Holótipo macho, alótipo fêmea e parátipos (2 fêmeas), depositados na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz sob os números 19.837 a 19.840.

Discussão — Ballesteros Márquez, em 1945, criou um novo gênero *Neyraplectana* que compreendia as seguintes espécies descritas anteriormente no gênero *Aplectana* Railliet & Henry, 1916 e que não possuem gubernáculo; *Neyraplectana crucifer* (Travassos, 1925), *N. pintoi* (Travassos, 1925), *N. vellardi* (Travassos, 1926), *N. linstowi* (Yorke & Maplestone, 1926), *N. schneideri* (Travassos, 1931). Pelo mesmo motivo julgamos dever incluir nêsse gênero as seguintes espécies: *Neyraplectana chilensis* (Lent & Freitas, 1948) n. comb. e *N. meridionalis* (Lent & Freitas, 1948) n. comb.

O gênero *Aplectana* possui atualmente muitas espécies, entre as quais duas não permitem uma identificação perfeita: *A. foecunda* (Rudolphi, 1819), assinalada em *Rana cornuta, Hyla* sp. e *Trachycephalus occipitalis* (Travassos, em 1931, considera possível o parasitismo dos dois últimos hospedadores por espécies diferentes de *A. foecunda*) e, *A. dubia* (Leidy, 1856), assinalada em *Bufo americanus* e *Salamandra rubra*.

Algumas espécies não possuem fêmeas descritas: *A. preputialis* (Skrjabin, 1916) com comprimento total e o bulbo menores que *A. lopesi*; *A. stromi* Travassos, 1931, que possui papilas com um escudo basal; *A. congolense* Schuurmans-Stekhoven, 1937, descrita como possuindo um bulbo anterior.

Das outras espécies, umas têm espículos maiores que *A. lopesi*: *A. acuminata* (Schrank, 1788); *A. membranosa* (Schneider, 1866); *A. perezi* (Gendre, 1911); *A. macinthoshii* (Stewart, 1914); *A. dogieli* (Skrjabin, 1916); *A. raillieti* Travassos, 1925; *A. tibetana* (Baylis, 1924); *A. chamaeleonis* (Baylis, 1929); *A. brumpti* Travassos, 1931; *A. baylisi* (Walton, 1933); *A. gigantica* Olson, 1938; *A. mexicana* Walton, 1940; *A. hamatospicula* Walton, 1940; *A. hoffmani* Bravo Hollis, 1943; *A. bonariensis* (Gutierrez, 1945). As espécies séguintes têm espículos menores: *A. unguiculata* (Rudolphi, 1819); *A. micropenis* Travassos, 1925; *A. hylambatis* (Baylis, 1927). As demais espécies, que possuem espículos aproximadamente iguais a *A. lopesi*, dela se diferenciam por outros caracteres, tais como: *A. pusilla* Miranda, 1924, tem comprimento total bem menor; *A. americana* Walton 1929, possui gubernáculo maior, menor número de papilas caudais e vulva mais perto da cauda; *A. longicaudata* Walton, 1929, tem menor número de papilas, bulbo menor, poro excretor mais afastado da extremidade anterior, anus mais distante da extremidade posterior, fêmeas menores e distância do anus à extremidade posterior menor; *A. flindersi* Johnston & Mawson, 1941, tem gubernáculo maior e diferente e não possue fêmeas descritas. *A. itzocanensis* Bravo Hollis, 1943, possui espículos com delgada bainha, gubernáculo maior, menor número de papilas caudais e fêmeas menores.

BIBLIOGRAFIA

Ballesteros Márquez, A.,

1945. Revision de la familia *Cosmocercidae* Travassos, 1925. *Rev. Ibér. Parasit., Granada,* Tomo Extraordinário: 150-180.

Bravo Hollis, M.,

1943. Dos nuevos nematodos parasitos de anuros del sur de Puebla. *An. Inst. Biol. Mexico,* **14**, 69-78.

Caballero y C., E.,

1949. Estudios helmintologicos de la region oncocercosa de Mexico y de la Republica de Guatemala. Nematoda 5ª parte. *An. Inst. Biol. Mexico*, 20 (1/2): 279-292, figs.

Fahel, J.,

1952. Fauna Helmintológica das Gias de Salvador (*Leptodactylus pentadactylus* (Laur.) *An. Acad. Brasil. Ci.* **24** (4) : 389-436, ests. 1-9, figs. 1-40.

Gutiérrez, R. O.,

1945. *Contribucion al conocimento de los nematodes parasitos de anfibios argentinos*. Tesis, Museo La Plata, n. 8; 37 pp., 24 figs.

Hsu, H. F. & Hoeppli, R.,

1933. On some parasitic nematodes collected in Amoy. *Peking Nat. Hist. Bull.* **8** : 155-168, 4 pls.

Johnston, T. H. & Mawson, P. M.,

1941. Some nematodes from Kangaroo Island, South Australia. *Rec. S. Aust. Mus. Adelaide*, **7** : 145-148, 14 figs.

Lent, H. & Freitas, J. F. T.,

1948. Uma coleção de Nematódeos, parasitos de vertebrados, do Museu de História Natural de Montevideo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **46** (1) : 1-71, figs. 1-136.

Lopez-Neyra, C. R.,

1944. Compendio de helmintologia ibérica. *Rev. Iber. Parasit.*, 4 (1) : 75-96; (2): 138-198; (3) : 209-342; (4): 403-492.

Olson, O. W.,

1938. *Aplectana gigantica* (Cosmocercidae), a new species of nematode from *Rana pretiosa*. *Trans. Amer. micr. Soc. Menasha*, **57** : 200-203, 1 est.

Schuurmans-Stekhoven Jr., J. H.,

1937. Parasitic Nematoda. *Inst. Parasit. Nat. Congo Belge, Brussels*, **4** : 1-40, 116 figs.

Travassos, L.,

1931. Pesquisas helmintológicas realizadas em Hamburgo. IX. Ensaio monográphico da família *Cosmocercidae* Trav., 1925 (Nematoda). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **25** (3) : 237-298, ests. 32-74, figs. 1-180.

Walton, A. C.,

1929. Studies on some nematodes of North American frogs. 1. *J. Parasit.*, **15** : 227-240, ests. 16-20.

Walton, A. C.,

1933. The Nematoda as parasites of Amphibia. *J. Parasit.*, **20** : 1-32, 1 est.

Walton, A. C.,

1933. Two new Nematodes and notes on new findings of Nematodes parasitic in Amphibia. *Proc. U.S. Nat. Mus.*, **82** (6) : 1-5.

Walton, A. C.,

1940. Notes on amphibian parasites. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, **7** : 87-91, 3 figs.

Walton, A. C.,

1941. The finer structure of *Aplectana hamatospicula* (Nematoda). *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, **8** : 18 21, 10 figs.

Yorke, W. & Maplestone, P. A.,

1926. *The Nematode parasites of Vertebates*, X + 536 pp., 307 figs., London.

O Problema da Lepra no Brasil (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araújo

INTRODUÇÃO

Há 28 anos publiquei no *American Journal of Tropical Medicine* (vol. V, May 3rd, 1925) um artigo descrevendo a situação do problema da lepra no Brasil. Estávamos, então, iniciando a sua profilaxia. Havia apenas 9003 leprosos fichados e sòmente 1963 isolados em primitivos asilos, e estimado o seu total em 24.000. A situação atual do problema é bastante diferente e digna, portanto, duma larga divulgação.

HISTÓRIA

Baseado no famoso tratado médico de Guilherme Piso (Holanda, 1648) e em muitas outras publicações feitas pelos jesuítas, que viveram durante 210 anos (de 1549 a 1759, quando foram expulsos) entre as nossas tribos indígenas, eu afirmei que, quando o Brasil foi descoberto aqui não havia lepra (*Leprosy Review*, VIII (1),Jan. 1937). Êste terrível flagelo foi importado com os colonizadores europeus (Portugueses, Franceses e Holandeses) e com os escravos africanos. Em 1585 a população do Brasil era constituida de 25.000 brancos, 18.500 indígenas e 14.000 escravos africanos, perfazendo o total de 57.000 (Barão do Rio Branco). Em 1798 a população do Brasil atingia 3.250.000 habitantes, dos quais 61% eram negros (Nina Rodrigues). Os principais portos de importação de negros foram o Rio de Janeiro, Bahia e Recife, onde a lepra tomou grande incremento. Durante o 1º século de funcionamento dos hospitais de leprosos dessas três cidades predominavam, nêles, os pacientes negros e mulatos na proporção de 75% do total. Deve-se ao Governador Martim de Sá (1618-1632) a primeira tentativa de fundação dum leprosário no Rio de Janeiro (Barão de Pôrto Seguro). Em 1637 e em 1697 o Conselho Municipal desta cidade reclamou do Rei de Portugal medidas de combate contra o flagelo. Em 1740 reuniu-se no Rio de Janeiro a 1.ª conferência médica para indicar as medidas profiláticas a serem executadas. Em 1741 (27 de Janeiro) a comissão médica da Côrte de Lisboa, especialmente designada, entregou o Regulamento de Profilaxia da Lepra para o Rio de Janeiro. A 7 de agôsto dêsse mesmo ano de 1741 inaugurava-se nesta cidade o 1.º asilo de leprosos do Brasil (obra de Gomes Freire de Andrade); em 1787 outro na Bahia e um 3º em Recife em 1789. O 1º dêles ainda existe (Hospital Frei Antônio), os outros dois foram fechados após 150 anos de bons servi-

(*) Trabalho lido a 3-IX-53 perante os Quintos Congressos Internacionais de Medicina Tropical e Malária. Istambul, 27-VIII a 4-IX-1953.

ços e remoção dos seus doentes para novas colônias. Durante o século XIX foram fundados outros asilos de leprosos nos Estados de São Paulo, Pará, Mato Grosso e Minas Gerais, os quais deram assistência a centenas de enfermos.

A moderna profilaxia teve início em 1921 com a criação duma Inspetoria especializada como parte do D.N.S.P.

EPIDEMIOLOGIA

A lepra está muito disseminada por todo o Brasil, mas a sua incidência por 1000 habitantes está subordinada a vários fatores mesológicos e biológicos. No quinqüênio de 1946 a 1950 foram fichados 22.245 casos novos de lepra, dos quais 12.578 (56,5%) eram abertos ou infectantes. Focos com mais de 70% de casos contagiantes foram encontrados em Minas Gerais (70,4%), Maranhão e Rio Grande do Norte (71,8%), Ceará (72,5%) e Piauí (82,4%). As mais baixas porcentagens de casos contagiantes foram registradas no Espírito Santo (39,3%) e São Paulo (48%), onde a profilaxia é mais antiga e mais perfeita. A 31 de dezembro de 1950 eram conhecidos 60.623 leprosos. Baseado neste total o Serviço Nacional de Lepra (Bol. vol. X, 1951) obteve os índices por 1000 habitantes do quadro 1. Os mais altos dêsses índices são os do Amazonas (4,84) e Pará (3,49) e os mais baixos da Bahia (0,06) e Alagôas (0,09). Acima de 1,7 por 1000 os de Minas Gerais (1,72), Espírito Santo (1,74) e São Paulo (2,34).

Do Norte para o Sul são os seguintes, sumàriamente, os característicos mais importantes da Lepra nos vários Estados.

De junho de 1921 a maio de 1922 iniciei no Pará o 1º Censo intensivo de leprosos feito no Brasil, fichando 1.354 doentes, sendo do sexo masculino 834 (61,6%) e do feminino 520 (38,4%); quanto a raças eram brancos 591 (43,6%), mestiços 670 (49,4%) e negros 93 (6,8%); e quanto à naturalidade brasileiros 1.246 (92,1%) e estrangeiros 108 (7,9%), e dêstes 89 de Portugal e Espanha. Quanto à idade do aparecimento do 1º sintoma (*onset*) eram 75 (5,5%) menores de 5 anos e 743 (54,8%) menores de 20. A baciloscopia foi positiva em 78,38% dos casos lepromatosos, 64,35% dos mistos e 37,23% dos nervosos.

A reação de Wassermann foi positiva, respectivamente, em 51,07; 43,8 e 25,07%. Do total de casos fichados 450 (32,2%) tinham parentes leprosos, em diferentes graus.

No Amazonas, de 1922 a 1928 foram fichados (A. da Matta, *Sci. Med.* 1929) 971 leprosos, sendo 667 (68,7%) do sexo masculino e 304 (31,3%) do feminino; nacionais 864 (89%) e estrangeiros 107 (11%), dêstes 31 de Portugal e Espanha. Daquele total eram residentes na Capital, Manaus, 551 (56,7%) e sòmente 287 (33,2%) do total geral nasceram no Amazonas. Eram naturais do Ceará 253 (29,2%).

Quanto à idade atual (dia do fichamento) eram: de 1 mês a 10 anos 43 (4,57%); de 11 a 20 anos 166 (17,03%), perfazendo 21,6% menores de 20 anos, fato muito diferente do Pará, onde êste grupo atingiu a 54,8%. De 21 a 40 anos eram 421 (42,36%) e acima de 40 anos 302 (31,43%).

Em São Paulo dos 2500 leprosos fichados de 1924 a 1929 (A. Sacramento, 1929) 2.276 (91,04%) eram brancos, 137 (5,48%) mestiços e 87 (3,48%) negros. 1516 (60,64%) eram do sexo masculino e 984 (39,3%) do feminino. Do total, 1.789 (71,56%) eram nacionais e 711 (28,44%)

QUADRO 1

S. N. L. — RESUMO DE CINCO ANOS DE ACTIVIDADES — 1946 A 1950

ESTADOS	CASOS NOVOS	CASOS ABERTOS	%	EXISTENTES EM 31-12-50	INCIDÊNCIA POR 1.000
Amazonas	1.221	797	65,3	2.591	4,84
Pará	1.129	519	46,0	4.026	3,49
Maranhão	345	248	71,9	1.416	0,87
Piauí	102	84	82,4	303	0,28
Ceará	454	329	72,5	1.544	0,56
Rio Grande do Norte	71	51	71,8	269	0,27
Paraíba	81	53	65,4	251	0,14
Pernambuco	222	155	68,9	946	0,27
Alagôas	23	15	65,2	104	0,09
Sergipe	95	51	53,7	167	0,25
Bahia	128	76	59,4	318	0,06
Minas Gerais	4.622	3.253	70,4	13.591	1,72
Espírito Santo	405	159	39,3	1.522	1,74
Rio de Janeiro	451	279	61,9	1.575	0,67
Distrito Federal	1.367	776	56,8	3.663	1,50
São Paulo	7.931	3.803	48,0	21.917	2,34
Paraná	1.226	798	65,1	2.510	1,14
Santa Catarina	833	193	58,0	744	0,47
Rio Grande do Sul	520	352	67,7	1.346	0,32
Goiás	1.019	584	57,4	1.823	1,44
TOTAL	22.245	12.578	56,5	60.623	1,12

Faltam os dados de Mato Grosso e Acre.

S. N. L. — TRABALHO REALIZADO EM:

	1946	1947	1948	1949	1950	TOTAIS
Casos novos fichados	3.990	4.202	4.499	4.910	4.691	22.245
Internados ou reinternados	5.672	6.138	6.459	6.469	7.481	32.219
Leprosos examinados nos Dispensários	5.119	4.005	5.058	5.361	6.693	26.236
Comunicantes fichados	11.926	12.604	13.927	17.686	15.757	71.900
Ditos re-examinados	20.220	18.082	22.145	28.237	35.162	123.846
Notificações verificadas	3.885	2.353	2.134	2.210	2.273	12.855
Pessoas examinadas para Diagnóstico	47.092	39.851	43.173	44.976	42.553	217.295
Domicílios visitados	6.711	7.299	9.918	12.396	9.904	46.228
Exames de laboratórios	45.522	53.309	75.884	77.838	84.121	336.674

estrangeiros e dêstes 467 (19,88%) italianos. Ainda do total geral 1.212 (48,48%) eram descendentes de italianos, 901 (36,04%) de brasileiros, 161 (6,44%) de portuguêses e 96 (3,84%) de espanhois, etc. Os grupos etários correspondentes ao *onset* eram: para os nacionais, menores de 10 anos 150 (6%), e de 11 a 20 anos 593 (23,72%), perfazendo 29,7% menores de 20 anos; de 20 a 30, 513 (20,52%) e de 31 a 60, 337 (18,8%), etc. Entre os 711 estrangeiros eram de 1 a 30 anos 171 (24,05%) e de 31 a 60, 412 (57,9%), etc.

Quanto ao tipo clínico 60,6% eram abertos ou contagiantes e 38,1% fechados ou não contagiantes.

Quanto à ocupação 612 (24,48% eram domésticos, 369 (14,76%) agricultores, 201 (8,04%) operários, 97 (3,88%3 escolares, etc. O exame dos 1.845 comunicantes fichados de 1924 a 1928 provou que 180 (9,75%) eram portadores de bacilos de Hansen (Pateo Junior, 1929), 113 (6,1%) eram suspeitos de lepra e 73 (3,9% já declarados leprosos. Dêstes 73 sòmente 1 não informou sôbre convivência domiciliar com leprosos; 38,2% tinham progenitores leprosos; 27,3% irmãos; 10,7% filhos e 16% cônjuge, como fócos infectantes.

De junho de 1924 até 31 de dezembro de 1945 foram fichados em São Paulo 25.594 leprosos e 72.079 comunicantes e os exames periódicos dêstes revelaram que 69.333 (96,18%) se conservaram sadios, 841 (1,17%) tornaram-se suspeitos e 1905 (2,64%) ficaram leprosos. Dêstes 999 (52,44%) eram do sexo masculino e 906 (47,56%) do feminino. (Pateo Junior, II Conferência Pan-Americana de Lepra, vol, I, p. 37, 1946). Dêsses 1905 casos secundários 529 (27,77%) tinham de 2 a 10 anos de idade; 1.295 (67,9%) de 11 a 60 e 81 (4,25%) acima de 60 anos. Do total, 1870 (98,16%) tiveram contacto domiciliar com leprosos e 35 (1,84%) extra domiciliar. Na ocasião do fichamento dêsses 1905 doentes 396 (20,78%) eram lepromatosos, 1.326 (69,61%) incaracterísticos, e 183 (9,61%) tuberculóides. 814 (42,2%) se infectaram com os progenitores e 521 (27,34%) com irmãos e irmãs. Do total 83,68% foram infectados por lepromatosos e 16,32% por incaracterísticos, portanto, nenhum por tuberculóides. Decorrido já outro período de 5 anos de vigilância seria desejável que o autor publicasse a situação daqueles 841 fichados como suspeitos.

No Estado do Paraná iniciei o censo dos leprosos em 1917 e publiquei em 1919 os dados sôbre 380 casos, estimando o total em 800, para os 600 mil habitantes. Esta estimativa foi considerada como exagerada. Atualmente tem o Estado 1.412.686 habitantes e o total de leprosos fichados atinge a 2.617, dando 1,85 por 1.000.

A.M. Moura analisando, em 1949, as 2.617 fichas de 21 anos (1926-1946), encontrou 2.077 (79,4%) lepromatosos; 335 (12,8%) indeterminados e 205 (7,8%) tuberculóides. 1.763 eram do sexo masculino e 854 do feminino, dando a relação de 2 para 1.

Quanto ao aparecimento da lepra (*onset*) eram menores de 4 anos 14 casos (0,53%) e menores de 20, 570 (21,6%); de 20 a 39, 1.277 (48,5%) e acima de 40 anos 770 (29,1%). Do total eram agricultores 47,49% e 28,58% domésticos, perfazendo 76% êstes dois grupos. Do total 864 (33%) faleceram no período da vigilância (21 anos).

O Estado de Minas Gerais foi dividido em 14 zonas para o combate à lepra, atividade que tomou grande incremento nestes últimos anos

De 1931 a 1947 foram fichados 15.986 leprosos, sendo 10.203 (63,82%) do sexo masculino e 5.783 (36,11%) do feminino. Eram infectantes 10.436 (65,28%) e fichados 5.550 (34|71%). Do total, 4.629 (28,95%) foram isolados em seis leprocômios e 7.109 (44,4%) ficaram sob vigilância. Nesse período de 17 anos foram fichados 47.905 comunicantes. Do total de doentes 2.062 (12,9%) eram menores de 20 anos e a grande maioria, 10.838 (67,78%) de 21 a 49 anos. Acima de 70 anos havia 269 (1,68%) e abaixo de 4 anos 22 (0,13%). Do total, 15715 eram nacionais (98,3%) e 271 (1,69%) estrangeiros e dêstes 183 italianos; 8.336 (52.14%) tiveram con-

tacto com leprosos e os restantes ignoravam. 48% dos doentes eram agricultores e 31,8% tinham ocupações domésticas (A. C. Horta, 1949).

A situação do problema em 30 de junho de 1949, segundo O. Diniz (Arq. Min. Leprologia, vol. X, jan. 1950), era a seguinte: Total de leprosos fichados 17.719. Sòmente três municípios do Estado estavam, aparentemente, imunes do flagelo. A incidência nos outros municípios variava de 1 a 4 leprosos por 1.000 habitantes, dando para as regiões: Centro-Norte 1,48; Este 1,53; Oéste 2,92; Sul 2,95 e para todo o Estado 2,09 por 1.000. Dos 50,590 comunicantes fichados Diniz estima em 6% (3.035) os já enfêrmos.

Dos doentes fichados 68,62% eram lepromatosos; 13,07% indeterminados e 18,1% tuberculóides. O foco leprótico mineiro é muito sério, especialmente considerando que sómente 4.807, ou 27,1% dos doentes estavam internados em seis leprocômios. O custo da profilaxia em 1949 atingiu a Cr$ 17.282.086.

DISTRITO FEDERAL

Em1930 havia no Distrito Federal cêrca de 1000 leprosos para 1.505.595 habitantes. Em 1950 havia 3.429 leprosos fichados para 2.413.152 habitantes (G. Malaquias, 1951). Aparentemente 78% dêsses leprosos adoeceram no Distrito Federal e 22% já vieram enfêrmos dos Estados ou do estrangeiro. Do total 27,8% eram menores de 20 anos; 40,4% de 21 a 40 e 31,8% acima de 40 anos. Estes dados provam que o Rio de Janeiro é um foco endemo-epidêmico de "extrema gravidade" (Malaquias). Informa o diretor do Serviço de Lepra Municipal que existem na cidade 1.500 leprosos contagiantes vivendo em promiscuidade com a população sadia.

PROFILAXIA

Sòmente em 1935 foi a lepra considerada como problema sanitário nacional e o gôverno federal incrementou a sua profilaxia em vários Estados, mediante acôrdos.

Quando, em 2 de Abril de 1941, foi criado pelo Decreto-lei n. 3.171 o Serviço Nacional de Lepra, já estavam fichados 44.396 leprosos e dêstes 16.000 isolados. O censo foi intensificado a partir de 16 de Dezembro e a 31 dêsse mês já eram conhecidos 48.028 leprosos, número que aumentou em 31 de Dezembro de 1942 para 53.571, dos quais 17.364 internados. Em 1943 aquele total subiu a 59.786. Em quatro anos de trabalho intensivo foram fichados 22.245 casos novos, assim distribuidos: em 1942, 5.543; em 1943, 6.223; em 1944, 5.159 e em 1945, 3.561. Aos 31 de Dezembro de 1945 estavam isolados 20.300 leprosos em 37 leprocômios e 2410 seus descendentes, ainda indemnes do mal, em 26 preventórios

A 2ª parte do Quadro 1 mostra que de 1946 a 1950 foram fichados mais 22.245 casos novos de lepra, dando a média anual de 4.449. Nesse mesmo quinqüênio foram fichados 71.900 novos comunicantes, dando a média de 3,2 por doente e desse total 34,9% eram crianças; e re-examinados 118.408 comunicantes antigos (23,1% do total conhecido), encontrando-se 1.785 (1,5%) casos secundários, sendo 1.093 (17%) em S. Paulo, 236 (5,2%) no Paraná e 138 (3,3%) no Rio Grande do Sul (Joir Fonte, 1951). Em 31 de Dezembro de 1950 sabia-se que dos 87.795 fichados

(dados incompletos) tinham falecido 25.310 e tiveram alta por cura clínica 1.518, restando 60.967 dos quais 22.954 (37,6%) isolados nos leprosários, 443 (0,7%) nos seus domicílios, 23.946 (39,3%) sob vigilancia nos dispensários e 13.624 (22,4%) sem qualquer vigilância. O total das despesas em todo o país para o combate à lepra em 1950 atingiu a 272 milhões de cruzeiros, dando o *per capita* por pessoa assistida de Cr$ 15,00, cabendo Cr$ 6,00 a cada habitante do país. A contribuição da União foi de 71% desse total, dos Estados de 27% e os restantes 2% couberam à assistência privada. Para o período de 1946 a 1950 o total dessa despesa subiu a Cr$ 697.429.563,40, distribuidos como segue: Amazonas 24.565.169,20; Pará 20.017.290,00; Maranhão 5.860.180; Piauí 2.947.400; Ceará 19.878.430; Rio Grande do Norte 2.796.891; Paraíba 2.911.787; Pernambuco ..... 7.102.278,40; Alagôas 1.820.829; Sergipe 2.833.340; Bahia 5.085.851,30; Minas Gerais 99.128.522,40; Espírito Santo 8.093.460; Rio de Janeiro 10.115.200; Distrito Federal 28.319.421,30; São Paulo 394.560.746,60; Paraná 17.650.172,60; Santa Catarina 12.098.860; Rio Grande do Sul (a partir de 1947) 16.842.368; Goiás 9.139.386,60; e Mato Grosso 5.661.980.

Durante 1951 o censo dos leprosos foi revisto em 32 municípios, nos quais foram examinadas, pela 1ª vez 9.587 pessôas, dentre as quais foram descobertos 426 leprosos e 127 suspeitos. Neste ano foram fichados 3.196 casos novos, faleceram ou tiveram alta hospitalar 1.034, ficaram em observação 486 e foram fichados 10.868 comunicantes. A 31 de Dezembro desse ano a situação do problema era a seguinte: Doentes isolados nos leprosários 22.207, em seus domicílios 451, sob vigilância dispensarial 25.603 e sem contrôle 14.868, perfazendo 63.129 leprosos e 213.295 comunicantes. A despesa da União em 1951 atingiu a Cr$ 36.000.000. Em 1952 foram descobertos mais 3.575 casos novos, 569 suspeitos e verificadas 750 mortes. Em 31 de Dezembro de 1952 havia nos 38 leprosários 23.421 doentes (Vide Quadro 2), isolados em domicílio 750, sob vigilância nos dispensários 28.770 e sem vigilância alguma 13.448, perfazendo 65.810 (total incompleto segundo o Dr. Rossas, 1953). A estimativa de 100.000 leprosos para os 50 milhões de habitantes do país (2 por 1000) não é exagerada.

LEPROSÁRIOS

Há no país, em funcionamento, 38 leprocômios, de vários tipos, sendo 2 no Território do Acre, 2 no Distrito Federal e 34 espalhados nos 20 Estados. Dos períodos colonial e imperial restam 3 hospitais. Dos 35 restantes o mais antigo é a Lazarópolis do Prata, fundada por mim no Pará em 1924 (V. Estampa 1). A maioria é do tipo colônia agro-pecuária, sendo modelar a Colônia Aimorés de Baurú, S. Paulo (V. Estampa 5); são do tipo sanatorial a Colônia Santa Teresa, de Santa Catarina (V. Estampa 6), o Padre Bento, de S. Paulo (Est. 4) e o Roça Grande, de Minas Gerais. Os maiores leprocômios do país são as Colônias Pirapitinguí (S. Paulo (Est. 3) com capacidade para 3.000 doentes e Santa Isabel (Minas Gerais) (Est. 2) para 2.500.

DISPENSÁRIOS

O Dispensário Anti-leproso é a "Célula Mater" da profilaxia da lepra e existem no país 93 deles, segundo informa o S.N.L. Para fazer a vigilância dos leprosos fichados e não-isolados, rever periódicamente o censo e

tratar os casos incipientes e não contagiantes, necessitamos, pelo menos, de 200 dispensários fixos e itinerantes. Nos Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Sul existem 51 unidades sanitárias cooperando na profilaxia da lepra.

QUADRO 2

INSTITUIÇÕES ANTILEPROSAS DO BRASIL

ESTADOS	LEPROSÁRIOS	INTERNADOS		PREVENTÓRIOS	INTERNADOS	
		1946	1952		1946	1952
Acre	Souza-Araujo	81	122	Santa Margarida		90
Acre	Cruzeiro do Sul	90	180	Cruzeiro do Sul		16
Amazonas	Belisário Penna	376	621	Gustavo Capanema	77	190
Amazonas	Antônio Aleixo	329	923			
Pará	Lazarópolis Prata	702	582	Santa Terezinha	52	290
Pará	Colônia Marituba	683	647	Eunice Weaver		
Pará	Frei Vila Nova	30	30			
Maranhão	Colônia Bonfim	268	504	Santo Antônio	40	89
Piauí	Colônia Carpina	170	259	Padre Damião	59	90
Ceará	Antônio Diogo	278	305	Eunice Weaver	113	190
Ceará	Antônio Justa	260	323			
R. G. do Norte	São F. de Assis	142	144	Oswaldo Cruz	60	74
Paraíba	Getúlio Vargas	81	97	Eunice Weaver	38	37
Pernambuco	Colônia Mirueira	242	341	Inst. Guararapes	80	90
Alagoas	Eduardo Rabello	28	36	Eunice Weaver	19	52
Sergipe	Lourenço Magalhães	38	74	São José	20	37
Bahia	Rodrigo de Menezes	68	148	Eunice Weaver	49	90
Espírito Santo	Colônia Itanhenga	388	457	Alzira Bley	135	206
Rio de Janeiro	Tavares de Macedo	375	547	Vista Alegre	102	126
Distrito Federal	H. C. Curupaití	641	835	Santa Maria	97	149
Distrito Federal	Frei Antônio	97	105			
São Paulo	Santo Angelo	1.604	1.582	Jacareí	295	389
São Paulo	Pirapitinguí	2.817	2.603	Santa Terezinha	257	255
São Paulo	Aimorés	1.316	1.058	Créche Carolino Mota e		
São Paulo	Cocais	1.890	1.819	Silva	47	131
São Paulo	Padre Bento	1.043	839			
Paraná	São Roque	789	886	Educandário Curitiba	111	206
Santa Catarina	Santa Teresa	433	417	Santa Catarina	142	126
R. G. do Sul	Colônia Itapuan	530	490	Santa Cruz	126	109
Minas Gerais	Santa Isabel	2.081	2.403	São Tarcísio	228	248
Minas Gerais	S. Franc. de Assis	644	931	Carlos Chagas	95	257
Minas Gerais	Santa Fé	1.026	1.060	Aprend. Profissional	20	46
Minas Gerais	Padre Damião	298	868	Olegário Maciel	164	202
Minas Gerais	Hospital Sabará	83	97	Eunice Weaver	—	22
Minas Gerais	Roça Grande	73	106	Ernani Agrícola	—	—
Goiás	Santa Marta	385	647	Afrânio Azevedo	72	178
Mato Grosso	São Julião	231	310	Getúlio Vargas	108	87
Mato Grosso	Sao João Lázaros	28	25			
TOTAIS		20.628	23.421	TOTAIS	2.557	4.045

PREVENTÓRIOS

Há no país 29 preventórios em funcionamento e 2 em construção. A maioria deles foi fundada pela Federação das Sociedades de Assistência aos Lázaros e defesa contra a Lepra. O preventório para filhos de leprosos é o complemento imperativo de qualquer serviço anti-leproso bem organizado. De 8 de Setembro de 1927, quando foi inaugurado o 1º preventório anti-leproso do Brasil (Asilo Santa Terezinha, S. Paulo, que é modelar, V. Est. 7), até 31 de Dezembro de 1951, foram internadas nos 28 preventórios, do Território do Acre, do Distrito Federal e de 20 Estados, 9.461 crianças, retiradas de ambientes infectuosos. Desse total 6.971 (73,7%) conviveram com leprosos; muitas foram segregadas ao nascer. Do total, 5.896 (62,3%) deixaram os preventórios: 305 (5,2%) por terem ficado leprosas; 2.978 (50,4%) por terem sido retiradas por parentes; 170 (2,9%) por terem terminado o período de vigilância; 1.243 (21,1%) abandonaram os preventórios por outros motivos e as restantes 1.202 (20,4%) faleceram. Em 21 de Dezembro de 1945 havia 2.410 crianças em 26 preventórios, cuja manutenção custou Cr$ 9.166.628, dando o *per capita* anual de Cr$ 2.194,60. O ano de 1945 foi o ano áureo da Federação por ter obtido de 22 Estados a contribuição de Cr$ 3.025.301,40, pouco menos de 1/3 do total das suas despesas. O Estado do Maranhão contribuiu com a menor soma, Cr$ 14.975; e as maiores provieram do Distrito Federal, Cr$ 320.665,70, do Paraná 332.923,70 e de São Paulo 333.892. A partir de 1946 cerca de 70% desse custeio correram por conta do Governo Federal. O número de internados em 1946 subiu a 2.557; em 1947 a 2.735; em 1950 a 3.487 e a 4.045 em 1952, quando o custeio dos preventórios atingiu à cerca de Cr$ 11.000,00. A Federação e o S.N.L. planejam construir novos preventórios e ampliar alguns dos existentes.

PESQUISAS SÔBRE A LEPRA E ENSINO DA LEPROLOGIA

A pesquisa e o ensino da leprologia são feitos no Brasil em quatro centros: no Instituto Oswaldo Cruz desde 1927, na Faculdade de Medicina de Belo Horizonte desde 1934, no Instituto de Higiêne e Departamento de Profilaxia da Lepra de S. Paulo e S.N.L. desde 1942. Existe a cátedra de leprologia nas Universidades do Distrito Federal (Faculdade de Ciências Médicas, desde 1936), de Minas Gerais e de S. Paulo. O Serviço Nacional de Lepra publicou um tratado de leprologia e várias monografias para distribuição gratuita, e também se editam no País vários periódicos especializados que têm contribuido consideravelmente para o conhecimento da lepra e para a sua profilaxia.

Rio de Janeiro, 28 de abril de 1953.

TRANSLATION

The Leprosy Problem in Brazil

INTRODUCTION

Twenty eight years have elapsed since I published in the American Journal of Tropical Medicine (Vol. V, May 3rd, 1925) an article describing the situation of Leprosy in Brazil. Then we were starting its control, having 9003 recorded cases and only 1,963 isolated in primitive asylums, and a total estimation of 24,000. Now the situation is quite different and worthy of wide divulgation.

HISTORY

Based upon the famous medical book of G. Pison (Holland, 1648) and on many others published by the Jesuits, who lived 210 years (from 1549 til 1759 when they were expelled) among our Indian tribes, I said that when Brazil was discovered leprosy was unknown here (Leprosy Review, VIII (1), Jan. 1937). This terrible disease was imported through European colonists (Portuguese, French and Dutch) and African slaves. The known population of Brazil in 1585 was constituted of white people 25,000, Indians 18,500 and 14,000 of African slaves, totalling 57,000 (Baron do Rio Branco). In 1798 the population of Brazil attained 3 and ¼ million, of which 61% were negros (Nina Rodrigues). The principal ports of importation of negros were Rio de Janeiro, Bahia and Recife, where leprosy progressed rapidly. During the first century of activity of the leper hospitals in these three cities predominated the negro and mulatto patients over the other people in the proportion of two thirds of the total. The first idea of a leprosarium in Rio de Janeiro belong to its Governor Martim de Sá (1618/32). In 1637 and in 1697 the City Council claimed for the control of the disease before the King of Portugal. In 1740 was held in Rio the lst meeting of its doctors to discuss the measures to be enforced. In 1741 (Jan. 27) the Court Committee of Physicians finished the Regulations of such control. On 7th August 1741 was inaugurated in Rio the lst leper Asylum of Brazil, in 1787 another in Bahia and a 3rd in Recife in 1789. The lst one still exists (Hospital Frei Antonio), the other two were closed after 150 years of good work and their patients moved for new colonies.

During the 19th century were founded other Leper Asylums in the States of São Paulo, Pará, Mato Grosso and Minas Gerais, which assisted hundreds of lazars. The modern control started in 1921 with the creation of a specialized Leprosy Section as part of the National Department of Public Health.

EPIDEMIOLOGY

Leprosy is widespread in Brazil, but its incidence per mille inhabitants is subordinated to various mesological and biological factors. From 1946 to 1950, five years period, were recorded 22,245 new cases of leprosy, of which 12,578 (or 56.5 per cent) were open. Foci with more than 70 p.c. infective cases were found in Minas Gerais (70.4%), Maranhão and Rio Grande do Norte (71.8%), Ceará (72.5%) and Piaui (82.4%). The lowest percentage of infective cases were registered in Espirito Santo (39.3%) and São Paulo (48.0%), where the control is more ancient and perfect. The known cases in December 31,1950 were 60,623 (See Table 1). Based upon this total the Serviço Nacional de Lepra (Boletim, v. X, 1951) obtained the indices of per mille incidences shown in the Table 1. The highest in Amazonas (4.84) and Pará (3.49) and the lowest in Bahia (0.06) and Alagôas (0.09). Above 1.7 per mille, were Minas Gerais (1.72), Espirito Santo (1.74) and São Paulo 2.34).

From North to South I will summarise, now, important facts about the characteristics of Leprosy in various States. From June 1921 to May 1922 I started in Pará the first intensive census of lepers done in Brazil, recording 1,354 cases, being males 834 (61.6%), females 520 (38.4%); white 591 (43.6%), mestizzos 670 (49.4%) and negros 93 (6.8%); natives

TABLE I

S.N.L. — SUMMARY OF FIVE YEARS ACTIVITIES — 1946 TO 1950

STATES	NEW CASES	OPEN CASES	PER CENT.	EXISTING DEC. 31,50	INCID. PER MILLE.
Amazonas	1,221	797	65.3	2,591	4.84
Pará	1.129	519	46.0	4.026	3.49
Maranhão	345	248	71.8	1,416	0.87
Piauí	102	84	82.4	303	0.28
Ceará	454	329	72.5	1,544	0.56
Rio Grande do Norte	71	51	71.8	269	0.27
Paraíba	81	53	65.4	251	0.14
Pernambuco	222	155	68.9	946	0.27
Alagôas	23	15	65.2	104	0.09
Sergipe	95	51	53.7	167	0.25
Bahia	128	76	59.4	318	0.06
Minas Gerais	4,622	3,253	70.4	13,591	1.72
Espírito Santo	405	159	39.3	1,522	1.74
Rio de Janeiro	451	279	61.9	1,575	0.67
Distrito Federal	1.367	776	56.8	3,663	1.50
São Paulo	7.931	3.806	48.0	21,917	2.34
Paraná	1,226	798	65.1	2,510	1.14
Santa Catarina	833	193	58.0	744	0.47
Rio Grande do Sul	520	352	67.7	1,346	0.32
Goiás	1,019	584	57.4	1,823	1.44
TOTA	22,245	12,578	56.5	60,623	1.12

Are missing the data from Mato Grosso and the Territories.

S. N. L. — FIVE YEARS ACTIVITIES

	1946	1947	1948	1949	1950	TOTAIS
New cases recorded	3,990	4,202	4,499	4,910	4,691	22,245
Interned or re-interned	5,672	6,138	6,459	6,469	7,481	31,219
Lepers examined in dispensaries	5,119	5,005	5,058	5,361	6,693	26,236
Contacts recorded	11,926	12,604	13,927	17,686	15,757	71,900
Contacts re-examined	20,220	18,082	22,145	28,237	35,162	123,846
Notifications verified	3,885	2,353	2,134	2,120	2,273	12,855
Persons examined for diagnose	47,092	39,851	43,173	44,976	42,553	217,295
Domiciles visited	6,711	7,299	9,918	12,396	9,904	46,228
Laboratory examinations	45,522	53,309	75,884	77,838	84,121	336,674

1.246 (92.1%) and aliens 108 (7.9%), of which 89 were from Portugal and Spain. The onset of the disease in 75 (5.5%) was below 5 years of age and in 743 (54.8%) below 20 years. Bacilloscopy was positive in 78.38% of the lepromatous cases, in 64.35% of the mixt and 37.23% in neural cases. The Wassermann test was also positive, respectively, in 51.07, 43.80 and 25.07%. Out of the total, 450 (33.2%) had leprous relatives, in different degrees.

In Amazonas from 1922 to 1928 were recorded (A. da Matta, Sci. med. 1929) 971 lepers, being 667 (68.7%) males and 304 (31.3%) females; natives 864 (89%) and aliens 107 (11%), of which 31 from Portugal and Spain. Out of the total 551 (56.7%) originated from the capital, Manáos, and only 287 (33,2%) of the total were born in Amazonas; from Ceará 253 (29.2%). The actual age groups were: 1 month to 10 years 43 (4.57%); 11 to 20, 166 (17.03%), making only 21.6% below 20 years, fact quite different from Pará where this group reached 54.8%. From 21 to 40, 421 (42.36%) and above 40 there were 302 (31.42%).

In São Paulo amongst 2,500 lepers recorded from 1924 to 1929 (A. A. Sacramento, 1929), 2,276 (91.04%) were whites, 137 (5.48%) mestizzos and 87 (3.48%) negros. Males 1,516 (69.64%) and 984 (39.36%) females. From the total 1,789 (71,56%) were natives and 711 (28.44%) aliens, from which 497 (19.88%) Italians. From the total 1.212 (48.48%) descended from Italians; 901 (36.04%) from Brazilians; 161 (6.44%) from Portuguese, and 96 (3.84%) from Spaniards, etc. The onset age groups were: Brazilians: below 10 years 150 (6.0%) and from 11 to 20 593 (23.72%), making 29.7% below 20 years of age; 20 to 30, 513 (20.52%), 31 to 60, 337 or 18.8%, etc. Aliens: 1 to 30 years 171 (24.05%); 31 to 60, 412 (57.9%), etc. According to clinic, 60.6% of the total were open and 38.1% closed cases. Occupations: 612 (24.48%) were household, 369 (14.76%) planters, 201 (8.04%) workers, 97 (3.88%) school children, etc. The examination of 1,845 contacts recorded from 1924 to 1928 showed that 180 (9.75%) were carriers of Hansen's bacillus (Pateo jor. 1929), 113 (6.1%) were suspicious as lepers and 73 (3.9%) were already declared lepers. Out of these 73 only one did not inform about home contact with lepers, and 38.2 had leprous parents, 27.3 brothers and sisters, 10.7 sons and 16.0% had mates, husband or wife as infectious foci.

From June 1924 til 31st December 1945 there were recorded in S. Paulo 25,594 lepers and 72,079 contacts. The follow-up of these and periodical examinations gave 69,333 healthy (96.18%), 841 (1.17%) suspicious and 1,905 (2.64%) already infected, being 999 (52.44%) males and 906 (47.56% females. (Pateo jor., II Pan Amer. Leprosy Conference, (I) : 37, 1946). From 2 to 10 years of age there were 529 (27.77%); from 11 to 60 years 1,295 (67.9%) and 81 (4.25%) above 60. Out of the total, 1,870 (98.16%) lived in the same domicile with the patients and only 35 (1.84%) had contact with visitors. When discovered those 1,905 sicks, 396 (20.78%) had lepromatous leprosy, 1,326 (69.61%) uncharacteristic (or better, incipient) and 183 (9.61%) tuberculoid leprosy. The infectious cases were parents for 814 (42.2%) and brothers and sisters for 521 (27.34%). Out of the total 83.68% were infected by lepromatous cases and 16.32% by uncharacteristic cases; none by tuberculoid ones. After another five years period of follow-up the author should have published the condition of those considered as suspicious, totalling 841.

In the State of Paraná (South Brazil) I started in 1917 the census of leprosy, publishing in 1919 the recorded cases of 380 and the estimation of 800 as total for 600,000 population. I was considered exaggerated. Now its population is 1,412,686 and the total recorded lepers amount to 2,617, giving the incidence of about 1.85 per mille. A. M. Moura (1949) summarised the 2,617 records of 21 years work (1926/46) showing that 2,077 (79.4%) were lepromatous, 335 (12.8%) indeterminate and 205 (7.8%) tuberculoid cases. Males were 1,763 and females 854 : relation 2:1. Age groups of the onset: below 4 years 14 cases (0.53%); below 20 years 570 (21.6%); 20 to 39, 1,277 (48.5%) and above 40 years 770 (29.1%). From the total 47.49% were planters and 28.58% household-workers totalling 76%. Out of the total 864 (33%) died during the period surveyed, 21 years.

The State of Minas Gerais was divided into 14 zones for the control of leprosy. The work of this State, the most populated and one the largest of Brazil, had progressed considerably these last few years. From 1931 until 1947 were recorded 15,986 lepers, being males 10,203 (63.82%) and females 5,783 (36.11%); open cases 10,436 (65.28%) and closed 5,550 (34.71%). Out of the total 4,629 (28.95%) were isolated in six institutions and 7,109 (44.47%) were under supervision. At the same period of 17 years were recorded 47,905 contacts. Amongst the patients 2,062 (12.9) were below 20 years of age and the great majority, 10,838 (67.78%) from 21 to 49. Above 70 years 269 (1.68%) and below a years 22 (0.13%). Out of the total 15,715 were natives (98.3%) and 271 (1.69%) aliens; of these 183 were Italians; 8,336 (52.14%) had contact with lepers, the rest ignored. The principal occupations of the patients were agriculture (48%) and home activities (31.8%) (A. C. Horta, 1949). The situation of the problem in June 30, 1949 in Minas was, according to O. Diniz (Arquivos Min. Lep. X, Jan. 1950): Total recorded lepers 17,719. Only three counties of the State are apparently immune from the scourge. The incidence of lepers per mille in the other counties ranged from 1 to more tran 4°/oo, giving for the Regions : Center-North 1.48; Est 1.53; West 2.92; South

2.95 and for the whole State 2.09 per mille population. The contacts recorded were 50,590 and the Diniz estimation of already infected was 6%. The clinical types of the known cases were: Lepromatous 68.62%; Indeterminate 13.07 and Tuberculoid 18.1%. The Minas focus is very serious, especially considering that only 4,807 (27.1%) were isolated in six leprosaria. The cost of the control in 1949 was Cr$ 17,282,086 or about US$ 850,000.00.

FEDERAL DISTRICT

With a population of 1,505,595 there were in 1930 in the Federal District about 1,000 lepers; in 1950 there were 3,429 recorded lepers for 2,413,152 population (G. Malaquias, 1951). Out of this total in 78% of the cases the disease appeared when living in the Federal District and 22% came already sick from the States or from foreign countries. From the total 27.8% were below 20 years of age, 40.4% from 21 to 40 and 31.8% above 40. These data prove that the Rio de Janeiro focus is endemo-epidemics of "extreme gravity" (Malaquias). He says that 1.500 open cases are living freely in promiscuity with healthy people.

CONTROL

Only in 1935 Leprosy was considered as a national health problem and the Federal Government increased its control in various States in a character of friendly cooperation because the Constitution does not permit the interference of the Union in any State affair. When, on 2nd April 1941 was created by Decree-law n. 3171 the Serviço Nacional de Lepra (National Service of Control of Leprosy) there were already known 44,396 lepers of which 16,000 were isolated. On December 16th the S.N.L. started the intensive census of lepers in various regions of the country. On 31st December 1941 there were 48,028 recorded lepers, which increased to 53,371 in 1942, when there were 17,364 isolated. In 1943 the total known cases amounted to 59,786. New cases recorded: in 1942, 5,543; in 1943, 6,223; in 1944, 5,159; and in 1945, 3,561, totalling 20,486 in four years of intensive work.

On 31st December 1945 there were 20,300 lepers isolated in 37 institutions and 2410 children of leprous parents in 26 preventoria.

The 2nd parte of Table 1 shows that in a five years' period (1946/50) there were recorded 22,245 new cases of leprosy, giving the annual mean of 4,449. There were also recorded 71,900 new contacts, giving the mean of 3.2 per case: out of which 34.9% were children. Amongst 118,408 old contacts re-examined (23.1% out of the known total) there were found 1,785 (1.5%) new lepers, of which 1,093 (17%) in São Paulo, 236 (5.2%) in Paraná and 138 (3.3%) in Rio Grande do Sul (Joir Fonte, 1951). On 31st December 1950 there were recorded 87,795 (incomplete data); known as dead 25,310 and paroled as negativated 1,518, leaving an expurgated

total of 60.967, of which 22,954 (37,6%) isolated in leprosaria; 443 (0.7%) isolated in their domiciles; 23,946 (39.3%) under dispensarial follow-up and 13,624 (22.4%) without any control.

The total expenses of the whole country for the control of leprosy in 1950 attained 272 million cruzeiros (US$ 13,600,000), costing each attended person about Cr$ 15.00, for which each inhabitant of the country contributed with Cr$ 6.00 per year. For such a large amount of money the Union contributed with 71 per cent, the States with 27 p.c. and the rest of 2 p.c. representing private contribution. The total expenses for the five years period of 1946/50 amounted to Cr$ 697,429,563.40 (or about US$ 34,875,000.00) for which São Paulo Contributed with 394.5 million and Minas Gerais with 99 million of cruzeiros.

During 1951 the census of lepers was revised in 32 counties, where 9,587 persons were examined for the first time, being discovered 426 lepers and 127 suspicious cases amongst them. On 31 December the situation was: new cases recorded 3,196; died and paroled 1,034; leaved for diagnosis, 486; new contacts recorded 10,868; sicks isolated in leprosaria 22,207; isolated in their domiciles 451; under dispensarial control 25,603; without any control 14,868, making the total of 63,129 lepers and 213,295 contacts. The total expenses of the Union in 1951 was Cr$ 36,000,000 ..... (US$ 1,800.000).

In 1952 there were recorded 3,575 new cases and 569 suspicious; known as being dead 750. On 31 December there were 23,421 lepers isolated in 38 leprosaria (See Table 2); 750 isolated in their domiciles; 28,770 under dispensarial follow-up and 13,448 without any control. The total left was 65,810 (incomplete according to Dr. Rossas, 1953). The estimation of 100,000 lepers for the fifty million population of the country (2 per mille) is not exaggerated.

LEPROSARIA

There are 38 in the country, being two in the Territory of Acre, two in the Federal District and 34 widespread in 20 States. From the colonial and imperial periods there remain only two primitive asylums and one hospital. From the other 35 (the oldest, Lazaropolis do Prata, was founded by me in 1924 in the State of Pará (See Plate 1); most are agro-pecuary colonies (the model is Aimorés Colony in Bauru, State of Sço Paulo, (See Plate 5) and sanatorial type, like Santa Tereza Colony, in Santa Catarina (See Plate 6), Padre Bento in São Paulo (See Plate 4), and Roça Grande in Minas Gerais. The largest ones are Pirapitinguí Colony (State of São Paulo) with capacity for 3,000 lepers and Santa Isabel Colony (Minas Gerais) for 2,500 patients. Table shows the increase of interned patients. Some of the leprosaria are being enlarged to complete the capacity for 25,000 patients.

DISPENSARIES

The Leprosy Clinic, called Dispensario, is the "Alma Mater" of the control of leprosy everywhere. There are in Brazil 93 of such institutions widespread in the country. To follow-up the recorded and not-interned

lepers, to revise the census and especially to give sulfonic treatment to all incipient and not-infectious cases we need at least 200 dispensaries. In the States of Pará, Maranhão, Piauí, Ceará and Rio Grande do Sul there are 51 sanitary units cooperating in the control leprosy.

LEPROSY INSTITUTIONS IN BRAZIL

TABLE 2

STATES	LEPROSARIA	INMATES		PREVENTORIA	INMATES	
		1946	1952		1946	1952
Acre	Souza-Araujo	81	122	Santa Margarida		10
Acre	Cruzeiro do Su	90	180	Cruzeiro do Sul		69
Amazonas	Belisário Penna	376	621	Gustavo Capanema	77	190
Amazonas	Antônio Aleixo	329	923			
Pará	Lazarópolis Prata	702	582	Santa Terezinha	52	
Pará	Colônia Marituba	683	647	Eunice Weaver		290
Pará	Frei Vila Nova	30	30			
Maranhão	Colônia Bonfim	268	504	Santo Antônio	40	89
Piauí	Colônia Carpina	170	259	Padre Damião	59	90
Ceará	Antônio Diogo	278	305	Eunice Weaver	113	196
Ceará	Antônio Justa	260	323			
R. G. do Norte	São F. de Assis	142	144	Oswaldo Cruz	60	74
Paraíba	Getúlio Vargas	81	97	Eunice Weaver	38	37
Pernambuco	Colônia Mirueira	242	341	Inst. Guararapes	80	90
Alagôas	Eduardo Rabello	28	36	Eunice Weaver	19	52
Sergipe	Lourenço Magalhães	38	74	São José	20	37
Bahia	Rodrigo de Menezes	68	148	Eunice Weaver	49	90
Espírito Santo	Colônia Itanhenga	388	457	Alzira Bley	135	206
Rio de Janeiro	Tavares de Macedo	375	547	Vista Alegre	102	126
Distrito Federal	H. C. Curupaití	641	835	Santa Maria	97	149
Distrito Federal	Frei Antônio	97	105			
São Paulo	Santo Angelo	1,604	1,582	Jacareí	295	386
São Paulo	Pirapitinguí	2,817	2,603	Santa Terezinha	257	255
São Paulo	Aimorés	1,316	1,058	Créche Carolino Mota e		
São Paulo	Cocais	1,890	1,819	Silva	47	131
São Paulo	Padre Bento	1,043	839			
Paraná	São Roque	789	886	Educandário Curitiba	111	296
Santa Catarina	Santa Teresa	433	417	Santa Catarina	142	126
R. G. do Sul	Colônia Itapuan	530	490	Santa Cruz	126	109
Minas Gerais	Santa Isabel	2,081	2,403	São Tarcísio	228	248
Minas Gerais	S. Franc. de Assis	644	931	Carlos Chagas	95	257
Minas Gerais	Santa Fé	1,026	1,060	Aprend. Profissional	20	46
Minas Gerais	Padre Damião	298	868	Olegário Maciel	164	202
Minas Gerais	Hospital Sabará	83	97	Eunice Weaver	—	—
Minas Gerais	Roça Grande	73	106	Ernani Agrícola	—	—
Goiás	Santa Marta	385	647	Afrânio Azevedo	32	178
Mato Grosso	São Julião	231	310	Getúlio Vargas	108	87
Mato Grosso	São João Lázaros	28	25			
TOTAIS		20,638	23,421	TOTAIS	2,557	4,045

PREVENTORIA

There are 29 Preventoria in operation and two others in construction. The majority of such institutions was organized by the Federação das Sociedades de Assistência aos Lázaros. The preventorium for healthy children from leprous parents is the imperative complement of a well organized service of control of leprosy. Since 8th September 1927, when was inaugurated the first Preventorium in Brazil (Asylo Santa Therezinha, São Paulo), which is a model (See Photo 7), until December 31,1951, there were interned in 28 preventoria of Acre Terrotory, Federal District and 20 States, 9,461 children. Out of these 6,971 (or 73.7%) had been "contacts" with lepers. Out of the total, 5,896 (62.3%) left the preventoria, as follows: 305 (5.2%) became lepers and were tranferred to leprosaria; 2,978 (50.4%) were taken by their relatives; 170 (2.9%) terminated their follow-up; 1,202 (20.4%) died, and 1,243 (21.1%) abandoned the preventoria by other motives. On 31 December 1945 there were 2,410 children in 26 preventaria, costing Cr$ 9,166,628 or a per capita per annum of Cr$ 2,194.60. This year was the golden year of the Federation, which got from 22 States the contribution of Cr$ 3,025,301.40, a little less than one third of the total expenses. After 1945 about 2/3 of their costs were paid by the Federal Government. In 1946 there were interned 2,557 children, in 1947 2,735, in 1950 increased to 3,487 and to 4,045 in 1952. The Federação and the Serviço Nacional de Lepra intend to built other preventoria and enlarge the actual ones.

LEPROSY RESEARCH AND TEACHING

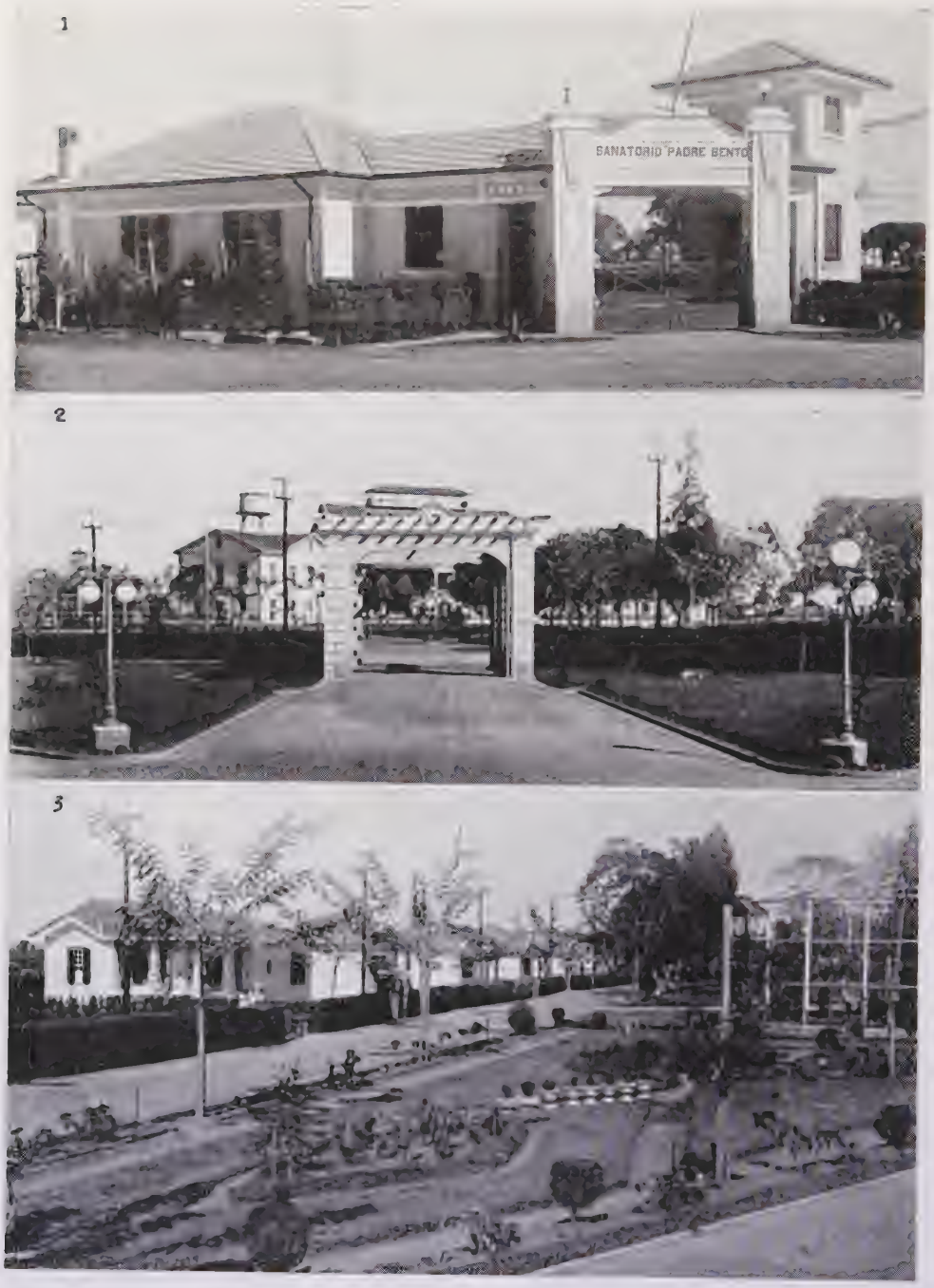
There are in Brazil four centres of research and teaching on leprology, viz: Instituto Oswaldo Cruz (since 1927), Medical School of Belo Horizonte (since 1934), Institute of Hygiene and Division of Leprosy Control in São Paulo and Serviço Nacional de Lepra (since 1942). A chair of leprology exists in three Universities : Districto Federal, Minas Gerais and São Paulo. The SNL published a Treatise and various monographs on Leprology for free distribution. There are also in Brazil various especialized periodicals for sanitary education and propaganda against leprosy, which help very much its knowledge and prophylaxis.

Rio de Janeiro, April 28, 1953.

Estampa 1 — Lazarópolis do Prata, Estado do Pará — Primeiro leprosário oficial do Brasil, fundado e inaugurado pelo Dr. Souza Araujo aos 24 de junho de 1924, sendo presidente da República o Dr. Epitacio Pessôa e Governador do Estado o Dr. Souza Castro. A figura 1 mostra os primitivos pavilhões da colônia; a figura 2 um grupo dos primeiros 314 doentes isolados até junho de 1924 e na figura 3 vê-se outro grupo de doentes em 1945, recebendo, festivamente, o fundador da Colônia. Lotação 1.000 leitos.

Estampa 2 — Colônia Santa Isabel, Estado de Minas Gerais — Planejada pelos Drs. Samuel Libanio e Antonio Aleixo, foi iniciada pela União a sua construção em 1921 e inaugurada em 23 de dezembro de 1931 pelo Governador Dr. Olegario Maciel. Tem capacidade para 2.500 doentes.

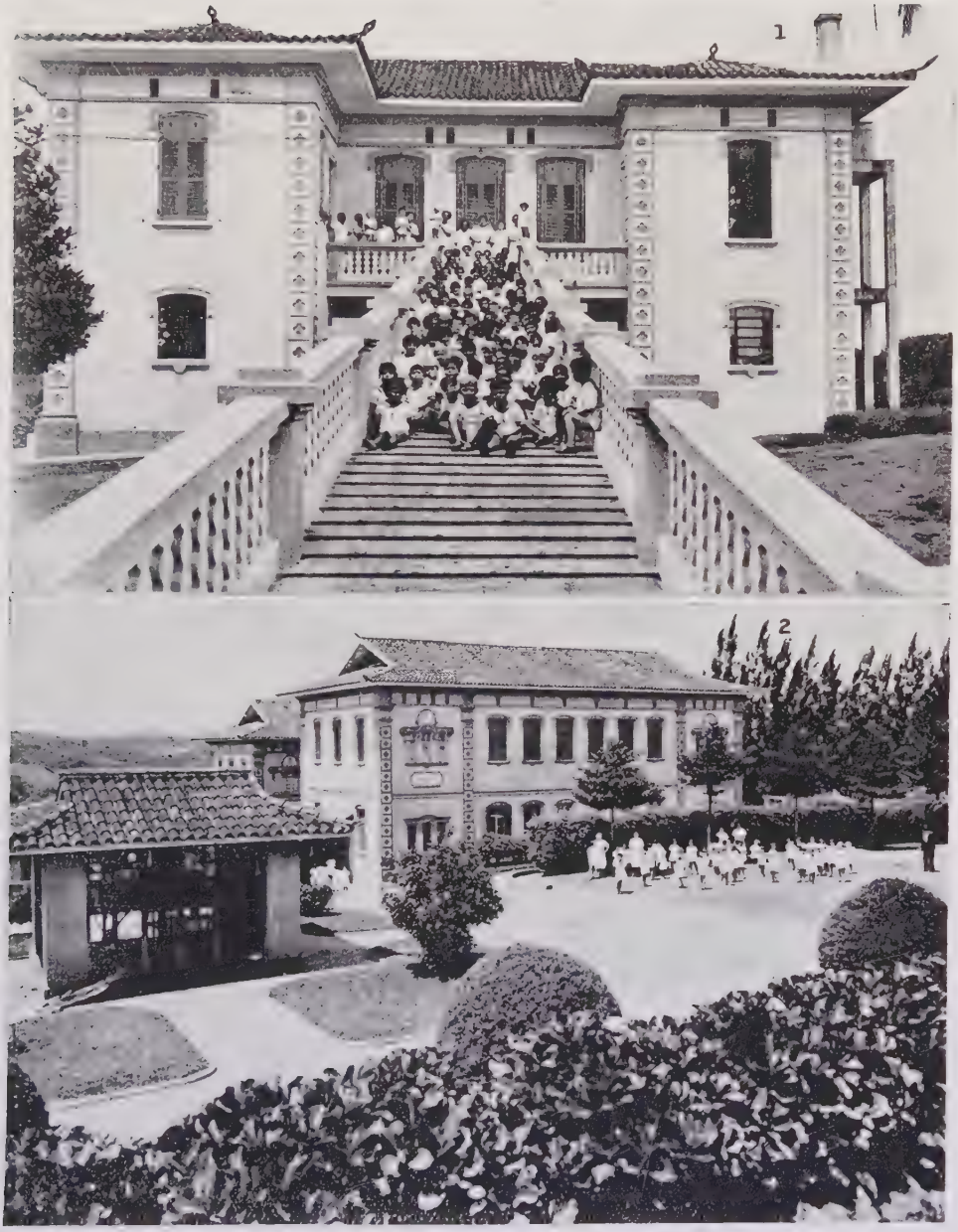
Estampa 3 — Sanatório-Colônia Pirapitinguí, Estado de São Paulo — A figura 1 mostra o núcleo de madeira mandado construir em começo de 1931 pelo Dr. João de Barros Barreto. Em junho dêsse ano o Dr. Souza Araujo, na qualidade de Inspetor Chefe de Profilaxia da Lepra, planejou, com a colaboração dos Engenheiros Mario Ayrosa, H. Pujol Junior e Palma Travassos, o projeto definitivo. Construção da firma Palma & Travassos. A figura 2 mostra metade da Avenida São Paulo, com confortáveis casas para casais; a figura 3 mostra uma série de pavilhões tipo «Carville», introduzido no Estado de São Paulo pelo Dr. Souza Araujo, e depois adotado em todo o país. A figura 4 mostra quatro pavilhões «Carville» reservados para moças solteiras, e uma ala do hospital geral. O núcleo de madeira foi inaugurado a 6 de outubro de 1931 e em 1935 a parte definitiva. É o maior leprosário do Brasil, com capacidade para 3.000 doentes.



Estampa 4 — Sanatório Padre Bento, Estado de São Paulo — Fundado e inaugurado pelo Dr. Souza Araujo em 5 de junho de 1931, na interventoria João Alberto, tendo sido muito ampliado posteriormente. Capacidade 1.000 leitos.

Estampa 5 — Sanatório-Colônia Aimorés, Estado de São Paulo — Iniciado em 1928 pelo consórcio dos Municípios do Noroeste e inaugurado a 13 de abril de 1933 na Interventoria do General Waldomiro de Lima. Construído por Palma & Travassos. Capacidade para 1.000 doentes. As fotos 1 e 2 (Souza-Araujo, 1944) mostram um aspecto interno do sanatório e um grupo de doentes saindo do pôsto médico, e n.º 3 (da administração) mostra uma série de confortáveis casas geminadas para dois casais de enfermos.

Estampa 6 — Colônia Santa Tereza, Estado de Santa Catarina — Construido pelo govêrno federal com a colaboração do estadual, inaugurada em 11 de março de 1940. E' um excelente tipo de pequena colônia-sanatório, com lotação para 500 doentes.



Estampa 7 — Asilo Santa Terezinha do Menino de Jesus, Estado de São Paulo — Projeto e planta do Arquiteto Adelardo Soares Caiuby (1922) e construído em grande parte com os 1.200 contos da subscrição pública aberta pelo jornal «Estado de São Paulo». Dois aspectos dêsse modelar preventório anti-leproso, obra grandiosa de iniciativa de D. Margarida Galvão, inaugurado aos 8 de setembro de 1927.

Novos Estudos sôbre a Lepra Murina (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

a) Infecção da macaca mulatta com o bacilo de Stefansky e passagem em Murídeos com o isolamento de duas culturas de bacilos a.a.r

Em dezembro de 1951 comuniquei à III Conferência Panamericana de Leprologia, em Buenos Aires (V. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 50, 1952), os meus primeiros ensaios sôbre a infecção de um macaco Rhesus com o bacilo da lepra murina, amostra do Instituto Pasteur de Paris, concluindo pela sua alta sensibilidade. Os nódulos obtidos foram extirpados para bacteriologia e histopatologia e após 70 dias de repouso, e completa cicatrização das biópsias, foi êsse animal re-inoculado com emulsão frêsca de leproma Stefansky, da mesma cêpa. Produziu-se re-infecção de incubação mais curta e reações locais e gerais muito mais intensas que na primeira infecção. No 14.º dia os nódulos cutâneos começaram a se ulcerar e a sua baciloscopia foi fortemente positiva (+++). Já havia eliminação do bacilo pelas fezes.

Com suspensão de nódulos biopsiados dêsse rhesus inoculei, a 31 de outubro de 1951, dois lotes de ratos e camundongos brancos. Triturado de nódulo da re-infecção, tratado pela soda e semeado em meios próprios, a 14 de fevereiro de 1952, produziu cultura de bacilos fortemente ácido-álcool resistentes.

A 4 de junho de 1952 sacrifiquei 2 dos camundongos inoculados a 31 de outubro de 1951, um dêles com grande tumor inguinal, cujo triturado mostrou abundantes bacilos a.a.r. com os caracteres do de Stefansky (V. fig. 4, Est. 1, nos Anais do Congresso), assim como a sua histopatologia (1). Essa

(1) P.C. 17.890, I.O.C., Pele, tumor e órgãos de Camundongo branco inoculado a 31-10-51, c/emulsão tumor Rhesus 5 (Stef.); sacrificado em 4-6-52: *Pele:* No derma e na hipoderma, existe infiltração celular inflamatória, com predominância de grandes células epitelióides que encerram, em abundância, bacilos a.a.r., longos, granulosos e vacuolados. Tais células também são encontradas, em grande número, em um pequeno gânglio linfático superficial. *Baço:* Presença, na polpa vermelha, de raras células contendo bacilos a.a.r. *Fígado:* Granulomas inflamatórios encerrando bacilos a.a.r. semelhantes aos descritos na lesão cutânea. *Rim:* Hiperemia. *Pulmão:* Hiperemia. Pequenas hemorragias. Rio, 24 de julho de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

(*) Trabalho apresentado pelo autor ao VI Congresso Internacional de Leprologia, Madrid 3/X/1953 e publicado nos seus Anais, com ilustrações, pp. 857/64.

suspensão foi inoculada no mesmo dia, em ratos e camundongos e semeada em «Loewenstein» produziu cultura de bacilos a.a.r. patogênica para rato segundo se vê da histopatologia (2) abaixo descrita.

INOCULUM DO 2.º RHESUS

A 5 de novembro de 1952 sacrifiquei um dos ratos inoculados a 4 de junho de 1952 (passagem do 1.º Rhesus), apresentando grande tumor inguinal, evoluído em 5 meses, cujas baciloscopia e histopatologia (3) eram características de leproma Stefansky, confirmada pelas electronomicrografias. Com parte dêsse tumor preparei 2 c.c. de suspensão que, após filtração em gaze, inoculei, por via subcutânea, na fronte, faces, lado esquerdo do peito (pele peluda) e no testículo direito, de um Rhesus de 3 anos de idade, que estêve em repouso no Biotério Geral do Instituto Oswaldo Cruz durante 14 meses e 20 dias, após extirpação dos nódulos produzidos por inoculação de cultura de lepra humana.

MARCHA DA INFECÇÃO

Ausência de reação local 24 horas depois. No 6.º dia (10/11/52) já se mostravam três nódulos, na fronte e faces, que a 14 de novembro se apresentavam avermelhados e do tamanho de grãos de milho. No 15.º dia (20 de novembro) foi o símio mostrado ao Dr. Yves Biraud, da Organização Mundial de Saúde, que se achava em visita ao nosso Laboratório; depois foi fotografado e escoriado um dos seus nódulos para baciloscopia, que foi fortemente positiva para bacilos e globias.

A 26 de novembro (22.º dia da inoculação): Os nódulos faciais começaram a murchar; no peito havia queda de pêlos e à palpação se sentia um tumor intracutâneo duro e do tamanho de uma amêndoa; o testículo direito estava enorme e duro, com o saco escrotal cianótico. A punção do tumor torácico deu serosidade sanguinolenta, e do testículo pus espêsso, cujas baciloscopias foram positivas para bacilos e globias e semeados êsses materiais, *in natura*, em «Loewenstein» mostraram germinação de colônias

---

(2) P. C. 18.098, I. O. C. Tumor e órgãos de Rato inoculado com cultura de camundongo branco infectado com tumor do Rhesus 5 (Stefansky), sacrificado a 22/8/52. *Pele:* No derma, infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, algumas células plasmáticas e grandes células mononucleares, as quais encerram bacilos ácido-álcool-resistentes. Em ponto circunscrito, necrose da epiderme e presença de fibrina e leucócitos polimorfonucleares. *Fígado, baço e rim:* hiperemia. *Pulmão:* hiperemia. Pequenas hemorragias, focos de edema e de atelectasia. *Nota*: Ausência de bacilos a.a.r. nos córtes dos órgãos internos examinados. Rio, 7 de outubro de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

(3) P. C. 18.257, I. O. C. Fragmentos de pele e de tumor de Rato branco, inoculado a 4/6/52 com emulsão de tumor de camundongo branco infectado com tumor do Rhesus 5 (Stefansky) e sacrificado a 5/11/52: "Presença de granuloma inflamatório, constituído por grandes células mononucleares, encerrando número considerável de bacilos a.a.r., êsse infiltrado forma volumoso nódulo que interessa a porção profunda do derma; vêem-se pequenos focos de infiltração celular, da mesma natureza. Epiderme sem alterações aparentes. Rio, 16 de dezembro de 1952» — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

amarelas no 35.º dia de incubação a 37°C (31/12/52). No mesmo dia 26 de novembro extirpei os nódulos das faces, enviando à Secção de Anatomia Patológica para estudo (4) um dêles e o outro foi utilizado em bacteriologia.

A 10 de dezembro o nódulo frontal, não biopsiado, estava ulcerado, com bordas salientes e côr avermelhada, de aspecto leishmaniótico; o tumor do peito em regressão, com nítida alopecia (idêntica à da foto 3, Estampa 1) e o testículo cada vez maior. A baciloscopia das fezes foi positiva. A 30 de dezembro as lesões estavam em franca cicatrização, na face; o tumor do peito do tamanho duma azeitona e o testículo inoculado 20 vezes maior que o oposto. A punção dêste órgão deu 2 c. c. de pus fluído e fétido, que foi semeado, *in natura*, em «Loewenstein» e «Dubos» e inoculado em dois camundongos, nos quais não produziu tumores. No mesmo dia semeei serosidade colhida do tumor do peito, também *in natura*, e após 33 dias de incubação a 37°C (29 de dezembro) um tubo de Loewenstein de cada série apresentava uma colônia amarela, circular, brilhante e de aspecto úmido.

Aos 5 de janeiro de 1953 sacrifiquei o símio, injectando-lhe clorofórmio nos pulmões. Feita a sua necropse não foram encontradas lesões macroscópicas nas vísceras. Extirpados o tumor do peito, que se achava sob uma placa de alopecia, e o testículo inoculado, que estava transformado numa bôlsa de pus fétido. A baciloscopia dêste pus e do tumor torácico revelou raros bacilos a.a.r. O tumor, os dois testículos e fragmentos das vísceras foram enviados à Secção de Anatomia Patológica, cuja histopatologia (5)

(4) P. C. 18.298, I. O. C. 27/11/52. Fragmento de pele da face do Rhesus n.º 7, inoculado a 5/11/52 com emulsão tumor Stefansky de rato, passagem do Rhesus n.º 5. *Pele:* Em ponto situado na porção profunda do derma, vê-se um foco constituído por material necrosado e por leucócitos, em tôrno do qual se encontram células mononucleares volumosas encerrando bacilos ácido-álcool-resistentes, longos e granulosos. Nota-se, também, moderada proliferação de fibrócitos, nessa região. Na porção mais superficial do derma, existe processo inflamatório agudo. Epiderme sem alterações importantes. Rio, 23 de dezembro de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*»

(5) PP.CC. 18.344/46, I. O. C., 5/1/53: Testículos do Rhesus n.º 7 inoculado a 5/11/52 com emulsão de leproma Stefansky de Rato, passagem de outro Rhesus, sacrificado a 5/1/53: «Em um córte encontra-se estrutura de testículo, sem alterações. Em outra preparação (testículo do lado oposto), vê-se uma porção central necrosada, em tôrno da qual é possível perceber alguns tubos seminíferos, parcialmente conservados, existindo uma intensa infiltração por leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, células plasmáticas, e grandes células mononucleares, dotadas de citoplasma abundante; muitas células destas apresentavam vacúolos no citoplasma. Tal processo inflamatório interessa a vaginal. Não são encontrados bacilos ácido-álcool-resistentes, neste material.» Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

. «Tumor do peito (lado esquerdo):

«Envolvendo focos de necrose dos tecidos, vê-se processo inflamatório, no qual tomam parte, além de linfócitos e de alguns leucócitos polimorfonucleares, grandes células mononucleares de citoplasma abundante, às vêzes vacuolado e células gigantes do tipo Langhans. Não é possível identificar bacilos ácido-álcool-resistentes.» Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

«*Coração:* sem alterações. *Rim:* sem alterações. *Pulmão:* sem alterações. *Baço:* Pequenas hemorragias. *Fígado:* Fócos de infiltração por células monocleares, no parênquima, formando pequenos granulomas (aliás múltiplos). Infiltração de alguns espaços porta por células mononucleares. Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

provou que a infecção não se generalizou, encontrando-se apenas no fígado múltiplos pequenos granulomas, no tumor torácico, já em franca regressão, predominavam as células mononucleares e gigantes do tipo Langhans.

BACTERIOLOGIA

O tumor do camundongo branco inoculado a 31/10/51 (passagem do Rhesus n.º 5) e sacrificado a 4/6/52 deu suspensão rica em bacilos: corada pelo Z-N mostrou muitas globias do tipo «boule épineuse» de Jeanselme; corada pelo «Fontes» revelou tôdas as formas clássicas do bacilo: desde um grande grânulo central, de duplo diâmetro do bacilo, até cocótrices com seis grânulos azuis, ligados por tênue protoplasma róseo; massas amorfas de simplasma róseo com muitos grânulos dispostos em várias posições. O bacilo de Stefansky corado pelo «Fontes» mostra-se mais delicado e menor que quando corado pelo Z-N. No conjunto acima ainda havia bacilos dispostos dois a dois, simulando divisão longitudinal. Êsses bacilos são fluorescentes à auramina, porém menos intensamente do que o bacilo de Koch (Dr. Laerte de Andrade).

As semeaduras dessa emulsão nos meios de Loewenstein, de Dorset e no caldo glicerinado, após 18 dias de incubação a 37º revelaram (23 de junho) apenas uma colônia amarela, circular, brilhante e de aspecto úmido num tubo de Dorset, véu e depósito brancos num tubo de caldo glicerinado, que se conservou límpido. Esta última cultura é muito semelhante à minha amostra Stefansky IV. Esfregaços dêsse véu, corados pelo Z-N e pelo «Fontes» mostraram elementos a.a.r. com as formas clássicas do bacilo de Stefansky. O véu foi repicado em vários meios de cultura.

A semeadura do tumor-soda do Rato (passagem do Rhesus 5, Stefansky) de 13 de outubro, a 25 de outubro de 1952 apresentava tênue véu branco no meio de Dubos. O «Loewenstein» semeado a 5 de junho com emulsão do tumor do camundongo branco (também passagem do Rhesus 5) apresentava-se a 25 de novembro coberto de um inducto amarelo claro, com denso depósito mucóide, côr de gêma de ôvo. Essa cultura deu fluoroscopia fortemente positiva e teste de Dubos negativo (Dr. Laerte de Andrade). Semeadura de 5 de junho no meio de Dorset a 25 de novembro formava delgada camada côr de ouro. A segunda geração de 15 de agôsto em «Loewenstein» formava delgada camada idêntica à cultura original e no agar glicerinado, cultura de 80 dias, formava um inducto amarelo-pardacento, brilhante e de aspecto úmido.

As semeaduras de materiais testiculares e tumorais do Rhesus 7 (inoculado a 5/11/52), após 33 dias de incubação a 37ºC apresentavam no «Loewestein», um tubo de cada série, uma colônia amarela idêntica às anteriormente descritas. A 31 de dezembro a cultura do pus testicular apresentava no «Loewenstein» delgada camada amarela, de aspecto úmido, e a cultura da serosidade do tumor apresentava uma grande colônia amarela no «Loewenstein» que estando sêco lhe adicionei algumas gotas de meio de Dubos. A semeadura dessa serosidade em «Dubos», de 26/11/52 apresentava a 6/1/53 meio límpido, com tênue véu subindo de 1 a 2 cm. pela parede do tubo e formando depósito. Corado pelo Z-N mostrou bacilos longos e cocóides; pelo «Fontes» tôdas as formas clássicas. A sua fluo-

roscopia foi fortemente positiva e a sua microscopia pelo contraste de fases (Dr. Muth) mostrou bacilos ligeiramente móveis e com as fórmas observadas em emulsão frêsca de leproma Stefansky. A segunda geração de 6 de janeiro examinada a 7 de fevereiro no Loewenstein (tubo grosso, de diâmetro duplo do comum) mostrou germinação em camada amarelo-pardacenta, ligeiramente elevada, brilhante e de aspecto úmido. Essa mesma segunda geração em «Dubos» apresentava véu branco-amarelo, subindo 2 mm. pela parede do tubo e com depósito. A sua fluoroscopia foi positiva e o teste de Dubos negativo a 8/2/53.

Essas novas culturas foram inoculadas em murídeos, que se acham em observação.

B) Novas culturas de bacilos A.A.R., tipos S e R isolados de ratos e camundongos infectados com bacilos de Stefansky misturados à Hidrazida.

Numa comunicação enviada ao VI Congresso Internacional de Microbiologia, a realizar-se em Roma, de 6 a 12 de setembro próximo futuro, descrevi, em resumo, as culturas de bacilos a.a.r. que isolei de murídeos infectados com bacilos de Stefansky misturados à Hidrazida. Trabalhando, desde 1947 até 1953, com material de lepra murina, amostra do Instituto Pasteur de Paris, gentilmente fornecido pelo Dr. R. Chaussinand, venho obtendo, reiteradas vêzes, o isolamento e cultivo artificial de dois tipos de culturas, uma cromogênica tipo S da classificação das Mycobactérias, fortemente a.a.r. e Gram positiva, moderadamente positiva à fluoroscopia, mas, não obstante ser negativa à reação cito-química para virulência de Dubos, é patogênica para as várias raças de murídeos. A outra, não cromogênica, tipo R, branca ou creme, formando nos meios sólidos colônias salientes e verrucosas, muito aderentes ao meio, fortemente positiva ao Z-N, Gram, fluoroscopia e teste de Dubos. De fato esta cultura, idêntica às minhas amostras Stefansky III e IV isoladas em 1949 de camundongos prêtos americanos inoculados com material original da amostra Chaussinand, é mais patogênica para murídeos do que a cromogênica. Nos meios líquidos — caldo glicerinado, Dubos e água glicerinada — ambas essas culturas produzem véus (amarelos ou brancos) e depósitos, sem turvar os meios. Pela insistência com que venho obtendo êsses dois tipos de bacilos, convenci-me de que a lepra murina, amostra do Instituto Pasteur, é produzida por uma infecção mista. Solicitei dos Professôres Chandler (Los Angeles, Califórnia) e Fielding (Sydney, Austrália) material de lepra murina daquelas regiões, para um estudo comparativo.

Dentre as várias experiências que fiz com o bacilo Stefansky e a Hidrazida, merece especial destaque a seguinte: aos 4 de julho de 1952, selecionei um dos ratos brancos inoculados com tumor Stefansky a 14 de janeiro de 1952, em excelente estado geral, com a pele e o sistema piloso normais e apresentando, na virilha direita, um regular tumor de 5 ½ meses de evolução, no qual tumor injetei, em 50 dias (4 de julho a 23 de agôsto de 1952) 130 miligramos de Hidrazida Schering (100 mg. por c.c.). Aos

4 de setembro (60.° dia), êste rato, parecendo muito doente, foi sacrificado. À autópsia apresentava um tumor do tamanho duma azeitona, encapsulado e aderente à pele abdominal e à musculatura da coxa, cujas baciloscopia e histopatologia (6) mostraram os caracteres do leproma Stefansky comum. Esfregaços dos gânglios e vísceras dêsse animal também foram positivos para bacilos a.a.r.

Suspensão dêsse tumor que, teòricamente, devia estar com os bacilos mortos pela Hidrazida, foi semeada nos meios próprios e inoculada num rato branco e num camondongo prêto. Noventa e dois dias após (9 de dezembro) foram êsses animais sacrificados e necropsiados mostraram pequeno tumor inguinal e gânglios infartados, cujos esfregaços foram fortemente positivos para bacilos a.a.r., assim como os seus fígados, pulmões e baços, nessa ordem.

A 11 de dezembro tratei pela soda o tumor do rato e os gânglios do camundongo e semeei-os em duas séries de tubos de «Loewenstein» e caldo glicerinado.

A 20 de dezembro começou a germinação nalguns tubos de «Loewenstein» e no fim da terceira semana das semeaduras (29 de dezembro) essa germinação era perfeitamente visível: cultura mista, colônias amarelas, circulares, brilhantes e de aspecto úmido, cercadas de colônias brancas punctiformes. Três tubos de Loewenstein semeados com triturado do tumor do Rato apresentavam, respectivamente, uma, duas e três dessas colônias amarelas e parte ou todo o resto da superfície do meio coberto de colônias brancas, punctiformes e sêcas. O terceiro dêsses tubos (de 11/12) é representado na fig. n.° 1 da Estampa 3, em côres, e a figura 2 representa um esfregaço de uma das colônias amarelas, corado pelo «Fontes» e a fig. 3 representa um esfregaço de uma das minúsculas colônias brancas (que o desenhista Sr. A. Pugas, do I.O.C., não pôde representar com a sua verdadeira côr branco-pérola) corado pelo Z-N. Por repicagem cuidadosamente feita pude separar, a partir da segunda geração, essas duas culturas.

As semeaduras de triturado dos gânglios bacilíferos do Camundongo preto apresentavam a 29/12 idêntico aspecto, em dois tubos de Loewenstein: uma colônia amarela, em cada um, cercada de minúsculas colônias brancas. Com o tempo se espraiou a cultura amarela idêntica à anteriormente isolada de tumor de camundongo branco infectado por passagem do bacilo de Stefansky do Rhesus 5. Morfológica e biològicamente essas culturas são iguais. Isolada no Loewenstein a cultura branca produziu colônias branco-pérola, conglomeradas, rugosas e sêcas do tipo R, parecida com certas amostras de bacilo de Koch da minha coleção. As figuras 7 e 8 da Estampa 3 representam, respectivamente, esfregaços corados pelo «Fontes»

(6) P. C. 18.136, I. O. C., 5/9/52. Fragmentos de pele e órgãos do rato inoculado com o bacilo Stefansky e injetado com 130 mgs. de Hidrazida. Sacrificado a 4/9/52. Resultado do exame histopatológico: «*Pele:* Discreta infiltração perivascular por células mononucleares (linfócitos), no derma. No hipoderma encontram-se nódulos, constituídos por células gigantes e grandes células mononucleares, encerrando bacilos a.a.r., em abundância. Em alguns pontos, no meio dêsse infiltrado inflamatório, vêem-se restos de tecido linfóide (gânglio linfático invadido?); em outros pontos, nota-se tecido muscular, comprometido pelo processo inflamatório. *Pulmão:* Pequenos fócos de hiperemia. *Baço: Rim* e *Fígado:* Hiperemia». Rio, 24 de outubro de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

e pelo Z-N de culturas amarelas, mucóides como as acima descritas, obtidas a primeira de tumor de rato por passagem do Rhesus 5 e a segunda diretamente de tumor do Rhesus 7, ambos inoculados com o bacilo de Stefansky.

RESUMO DOS CARACTERÍSTICOS DAS CULTURAS

Amostra amarela: corada pelo Z-N, apresenta bacilos de tamanho mediano; corada pelo «Fontes», apresenta bacilos típicos na sua maioria com o citoplasma róseo e grânulos azuis escuros; a sua fluoroscopia é moderadamente positiva e negativa à reação de Dubos. A amostra branca, eugônica, é também fortemente ácido-álcool-resistente, Gram positiva e corada pelo «Fontes» mostra tôdas as fórmas clássicas das Mycobactérias. A sua fluoroscopia é tão forte quanto a do mais virulento bacilo de Koch, assim também a sua resposta à reação de Dubos. Ambos êsses tipos de mycobactérias foram inoculados em vários lotes de murídeos, dos quais alguns já foram estudados, bacteriológica e histopatològicamente, e muitos outros continuam em observação.

Escrito em Athenas, 20 de agôsto de 1953.

TRANSLATION

New studies upon rat leprosy (*)

A) Infection of rhesus monkey with Stefansky bacillus, transferred to murines and followed by isolation of two strain of acid-fast bacilli

On December 1951 I communicated to the III Pan-American Leprosy Conference, in Buenos Aires (See Memorias Inst. Osw. Cruz, 50, 1952, pp. 691/8), my preliminary attempts to infect Rhesus monkey with rat leprosy bacilli, strain from Institut Pasteur of Paris, proving its high sensitiveness. The nodules produced in it were extirpated and used in bacteriology and histopathology. After 70 days rest and complete cicatrization of the biopsies, the animal was re-inoculated with fresh suspension of rat leproma of the same strain. Re-infection was produced in shorter period of incubation, with stronger local and general reactions (See figs. 1 and 2, Plate 1). At the 14th day the skin nodules ulcerated, which smears were strongly positive for acid-fast bacilli (+++). The baciloscopy of the Rhesus faeces was then positive too.

On 31st October 1951 I inoculated two lots of white rats and mice with suspension of nodules of said Rhesus. Triturate of a Rhesus re-infection nodule, treated with 10 % NaOH solution, and smeared in suitable media on February 1952, produced culture of acid-fast bacilli.

On June 4th 1952 two of those mice inoculated on 31st Ostober 1951, were killed, one showing a big groin tumor, strongly positive for acid-fast

(*) Paper presented by the Author at the VI International Congress of Leprology, held in Madrid, October 3 to 10, 1953 See pp. 857/64 of its Report.

bacilli similar to Stefansky's ones (See Fig. 4 Pl. 1), as well as its histopathology (1).

Said suspension was inoculated, in the same day, in rats and mice and smeared onto Loewenstein medium, developing culture of acid-fast bacilli, pathogenic for rat accordingly to the below histopathological report (2).

INOCULUM OF THE 2ND RHESUS

One of the rats inoculated on June 4th 1952 (1st passage from the Rhesus) was killed on November 5, 1952, presenting one big inguinal tumor, of 5 months evolution, which bacilloscopy and histopathology (3) were characteristic of Stefansky's leproma, confirmed by electronomicrography. With part of such tumor I prepared 2 cm^3 of suspension in saline, which I inoculated, subcutaneously, in the forehead and cheeks (glabrous) and left side of the breast (heared skin) and right testicle of one 3 years old Rhesus, which was resting in the general bioterium since 14 months and 20 days, completely cured from an infection produced by a human leprous culture.

COURSE OF THE INFECTION

No local reaction within 24 hours. On November 10th (6th day of inoculation) were seen three nodules in the face (inoculation sites) which, 4 days later, were red and of corn grain size. November 20th (15th day of incubation) the mankey was shown to Dr. Yves Biraud, member of the World Health Organization, who was visiting my laboratory, after it had been photographed and made smears from the face nodules for bacilloscopy which was strongly positive for bacilli and globi. November 26th (22th day of incubation). The facial nodules became soft; on the breast appeared one plaque of alopecia and by palpation was noticed one hard

(1) P. C. 18.890, I.O.C. — Skin, tumor and viscera of one white mouse, inoculated on 31-X-1951 with suspension of Rhesus n. 5 nodule (Stef.) killed on 4th June 1952. Skin — Derma and hypoderma showing infiltration of inflammatory cells, with predominance of epitheliod cells with abundant acid-fast bacilli, large, granulated and vacuolated. These cells were seen also in great number, in sections of one small superficial lymphnode. *Spleen* — In the red pulp a few cells with acid-fast bacilli. *Liver* — Inflammatory granulomas containing acid-fast bacilli similar to those found in the skin. *Kidney* — Hyperhemia. *Lung* — Hyperhemia. Small hemorrhagic foci. Rio, July 24, 1952. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

(2) P. C. 18.098, I.O.C. Tumor and organs of Rat inoculated with culture from white Rhesus 5 tumor (Stef.), killed on August 22nd, 1952. *Skin* — Infiltration of derma by lymphocytes, some plasmazellen and mononuclear cells, with acid-fast bacilli. In circumscrit point, necrosis of the epidermis, presence of fibrina and polymorphonuclear cells. *Liver, Spleen* and *Kidney*: — hyperhemia, *Lung*: — Hyperhemia. Small foci of hemorrhage, oedema and atelectasis. Absence of a-f bacilli in such organs. Rio, October 7th 1952. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

(3) P. C. 18.257, I.O.C. Pieces of skin and tumor of white rat inoculated on 4-VI-52 with suspension of tumor of white mouse infected with tumor from the Rhesus n. 5 (Stef.), killed on 5-IX-52: «Presence of inflammatory granuloma, formed by large mononuclear cells, with enormous number of acid-fast bacilli. Such infiltrate forms large nodule which penetrates the deep portion of the derma. There are also small foci of celiular infiltration, of the same nature. No apparent alteration in the epidermis. Rio, 16-XII-52. — *Dr. Rita R. de A. Cardoso.*

intracutaneous tumor of an olive size; the right inoculated testicle was hard and much enlarged, with cyanotic scrotum. The puncture of thoracic tumor gave bloody serosity and that of testicle gave purulent thick material, whose bacilloscopy was positive for bacilli and globi. Such materials, sown *in natura*, on Loewenstein medium, incubated at 37°C.during 35 days (until December 31st 1952) produced yellow colonies. Two facial nodules, biopsied on November 26th, one was sent for histopathology (4) and the other used for bacteriology.

On 10th December the Rhesus showed one non biopsied frontal nodule, ulcerated, red, with elevated margins simulating a leishmaniotic lesion; the breast tumor smaller, under a typical alopecia (similar to photo 3, Plate 1) and the infected testicle much larger. The bacilloscopy of its faeces was positive. On 30th December all the facial lesions were in frank cicatrization; the breast tumor reduced to a nodule of olive size and the inoculated testicle 20 times larger than the normal one. The puncture of this organ gave 2 c.c. of a purulent and fetid fluid, which was inoculated in two mice with negative result, and was sown, *in natura*, in Loewenstein and Dubos media, as was made also with the fluid aspirated from the breast tumor. After 33 days incubation at 37°C. one tube of Loewenstein of each series showed one yellow, circular colony, of humid aspect.

On 5th January 1953 the monkey was killed with chlorophorm. The necropsy did not show any macroscopic visceral lesion. The tumor of the breast and the sick testicle were extirpated. The last one was transformed into one large collection of fetid milky fluid, bacilloscopy of which showed very few acid-fast bacilli, as occurred with the tumor. This tumor, both testicles and pieces of each organ were sent to the Division of Pathology for examination, which report (5) proved that the infection was not generalized; only in section of the liver were found multiple small granulomata and in section of the tumor predominated mononuclear cells and giant cells of Langhans type.

---

(4) P. C. 18.298, I.O.C., 27-XI-52. Skin of the face of Rhesus n. 7, inoculated on November 5th with suspension of rat leproma, passage from Rhesus n. 5. *Skin* — In deep derma is seen one focus of necrosed material and leucocytes, around which are found large mononucleatr cells with large and granulated acid-fast bacilli. In the same region is seen also moderate proliferation of fibroblasts. In the superficial part of the derma exists an acute inflammatory process. No alteration in the epidermis. Rio, 23-XII-52. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

(5) P.P.C.C., 18.344/46, I.O.C., Jan. 5, 1953: *Rhesus* n. 7 inoculated on 5thXI-52 with rat leproma suspension, passage from other Rhesus killed January, 5th 1953. — *Testicles:* Section of one shows normal structure. Section of the other one (inoculated) shows necrotic center, around which are seen a few partially preserved seminiferus tubes; intense infiltration of polymorphonuclear cells, lymphocytes, plasmacells and large mononuclear cells with abundant cytoplasm; many vacuolated mononuclear cells. Such inflammatory process is also seen in the vaginal. No acid-fast bacilli in such sections. *Breast tumor* (left-side) — Around the necrotic tissue foci is seen an inflammatory process of lymphocytes, polymorphous nuclear cells, large mononuclear cells with abundant cytoplasm, sometimes vacuolated and Langhans giant cells. No acid-fast bacilli were found in such sections. *Heart, Kidneys* and *Lungs:* — without alterations. *Spleen* — Small foci of hemorrhage. *Liver* — Multiple small granulomas of mononuclear cells in the parenchyma. Infiltration by mononuclear cells in some portal — spaces.

Rio, February, 6th, 1953. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

BACTERIOLOGY

White mouse inoculated on 31 st October 1951 with Stefansky's leproma (passage from Rhesus n. 5), killed on 4th June 1952 showed inguinal tumor the smear of which stained by Ziehl-Neelsen method, was abundant in bacilli and globi («boule épineuse» Jeanselme's type). Smear of the tumor stained by Fontes method showed all the classical forms of the bacillus: with a large central nodule, with two terminal nodules or coccothrices with six nodules connected by a rose-pale cytoplasma; disform masses of rose symplasm with many dark-blue nodules widespread irregularly. The Stefansky's bacillus stained by «Fontes» is smaller and thinner than when stained by Ziehl-Neelsen. Many bacilli appear arrangend by two, simulating longitudinal division. Such bacilli are less fluorescent (using auramina) than the Koch's bacilli. The suspension of this mouse tumor sown on Loewenstein, Dorset and glycerin broth, ou 23rd June (after 18 days incubation at 37°C.) grew only one yellow circular and shinning colony on Dorset and white pellicle and sediment in glycerin broth, the liquid remaining limpid. This last culture is similar to my old strain Stefansky IV. Smears of the veil stained by Ziehl-Neelsen and «Fontes» showed acid-fast elements with the classical morphology of rat leprosy bacillus. The sub-culture of the pellicle in various media grew normally. The sowing of rat tumor suspension, treated by soda (passage from Rhesus n. 5) incubated at 37°C. from October 13th to 25th, 1952, showed thin pellicle on Dubos medium. Sowing in June 5th of suspension of tumor of white mouse (passage from the same Rhesus n. 5), on 25th November grew Loewenstein covering its surface a mucoid yellow layer, forming a dense deposit. This culture was strongly fluorescent but negative for Dubos cytochemical test for virulence. On Dorset medium sowing of the same day (June 5th) showed a thin layer of yellow culture. Subculture, 2nd generation from August 15th, on November 25th showed on Loewenstein a thin yellow layer similar to the original culture. A 80 days old subculture on glycerin agar formed a compact layer, dark-yellow, of humid and bright aspect. Sowing of testis and tumor materials of Rhesus n. 7 (inoculated November 5th, 1952) after 33 days incubation at 37°C., one tube of Loewenstein of each series, showed one yellowish colony similar to the above described.

On 31st December 1952 the testicular fluid sowing showed, on Loewenstein, a thin layer of yellow culture, of humid aspect, and the other of the tumors on the same medium, showed a large yellow colony, and inoculated in Dubos showed on 6th January 1953 a thin veil and deposit. The liquid remained limpid. Smears of such cultures showed large bacilli and cocobacilli, when stained by Ziehl; by Fontes showed all the classical forms of the bacillus. Such cultured bacilli were strongly fluorescent and by contrast phases microscopy showed slight motility, like in the fresh rat leproma suspension (Dr. Muth). The 2nd generation of January 6th, on February 7th (large tube of Loewenstein) showed germination, of a dark yellow elevated layer, shining and of humid aspect. The same 2nd generation in Dubos showed a white yellowish pellicle climbing 2 mm the tube wall and forming deposit. Its fluoroscopy was positive and its Dubos test negative (Feb. 8, 1953). Photos d) and f) plate 2 give an idea of said cultures which were inoculated in murines.

B) NEW STRAINS OF ACID-FAST BACILLI, S AND R TYPES ISOLATED FROM RATS AND MICE INFECTED WITH STEFANSKY'S BACILLI, MIXED WITH HYDRAZID

In a paper sent to the VI International Congress for Microbiology (Rome, 6-12 september 1953), I gave a summarized description of acid-fast bacilli isolated from murines inoculated with a mixture of rat leproma suspension and hydrazid. Working from 1947 till 1953 with rat leprosy strain from Institut Pasteur of Paris, kindly fournished by Dr. Chaussinand, I was able to obtain, repeatedly, cultures of two types, one chromogenic, S type, strongly acid-fast and Gram positive, moderately positive by fluoroscopy and Dubos test negative, but pathogenic for various races of murines. The other one, non-chromogenic, R type, white or slightly cream, producing in solid media dry and elevated colonies, strongly adherent to the media, strongly positive for acid-fastness, Gram, fluoroscopy and Dubos test. Such culture, identical with my strains Stefansky III and IV isolated in 1949 from American black mice infected with the same Pasteur Institute rat leprosy strain, is more pathogenic for murines than the chromogenic ones. Both S and R strains produced pellicles on glycerin broth, glycerin water and Dubos medium, without turbidity.

Due to the insistence in obtaining said two types of cultures I am convinced that the rat leprosy from Pasteur Institute is caused by a mixed infection. I asked Professor Chandler (Los Angeles, California) and Professor Fielding (Sydney, Australia) for some lepromata of rat leprosy from these regions for a comparative study. Amongst the various researches I have done with Stefansky's bacillus and hydrazid, the following is worthy of more consideration: On 4th July 1952 I took one white rat with a right groin leproma of 5.5 months duration, into which I inoculated, within 50 days (4 July to Aug. 23, 1952), 130 milligrams of Schering Hydrazid (100 mg. per c.c.). Sixty days afterwards (September 4th) this rat being too sick it was killed, showing at autopsy an olive size groin tumor, encapsulated and adherent to the abdominal skin thigh muscles, which baciloscopy and histopatrology (6) showed the characteristics of a normal Stefansky's leproma.

Smears from viscera and lymphnodes of such rat were also positive for acid-fast bacilli. Suspension of such tumor, in which the bacilli should be killed by Hydrazid, was smeared into different media and inoculated in one white rat and one black mouse. After 92 days incubation (Dec. 9th) these animals being killed and necropsied showed small inguinal tumors and enlarged lymph-nodes, the smears of which were strongly positive for acid- fast bacilli, as well as the smears of their livers, lungs and spleens. On 11th December I treated, by Petroff method, the tumor of the rat and the

(6) P. C. 18.136, I.O.C., 5-9-52. Pieces of skin and organs from one rat infected with Stefansky bacilli and injected with 130 mg. of Hydrazid. Killed on 4th September 1952 — Report of histopathology — *Skin* — Moderate perivascular infiltration by lymphocytes introderma. In the hypoderma are seen nodules of giant cells and large mononuclear cells, filled with acid-fast bacilli. In certain points, inside said inflammatory infiltrate are seen remains of lymphoid tissue (invaded lymph node?); in other points is observed muscular tissue, invaded by the inflammatory process. *Lung* — Small foci of hyperhemia. *Spleen, Kidney* and *Liver*: hyperhemia.

Rio, 24-10-52. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso*».

lymph-nodes of the mouse and sowed both materials in two series of tubes of Loewenstein and glycerin broth. Nine days later (Dec. 20th) started germination in a few tubes of Loewenstein and on 29th December such growing was perfectly visible: mixed culture, some yellow circular and shining colonies, circumscribed by punctiform white colonies. Three tubes of Loewenstein medium sown with suspension of Rat's tumor showed, respectively, one, two and three yellow colonies and part of or all surface of the medium covered with the said white and punctiform dry colonies. The third of these tubes on 11th December is represented by figure 1, Plate 3, in colours, and figure 2 represents a smear of one of these yellow stained by Fontes method, and figure 3 represents another smear of one white small colony stained by Ziehl-Neelsen. By careful transplants I could separate these two strains since their 2nd generation.

Sowings of the bacilliferous lymph-nodes of black mouse showed, on 29th December, germination of identical aspect as the above in two tubes of Loewenstein: in each tube one yellow colony circumscribed by many other small white colonies. Figure 4, plate 3, shows the spread yellow colony Figure 6, plate 3, shows yellow colony identical as n.° 4, previously obtained from tumor of one white mouse infected by Stefansky's transferred from Rhesus n. 5. Morphologically and biologically these strains are equal. The white culture of tube 4 (Plate 3), as seen in figure 5 of the same plate, produced white-pearl, conglomerated colonies of R type, similar to certain strains of Koch's bacillus of my collection. Figures 7 and 8, Plate 3, represent, respectively, smears of yellow and mucoid cultures, stained by Fontes and by Ziehl-Neelsen, the first obtained from rat tumor, passage from Rhesus n. 5 and the 2nd directly from tumor of Rhesus n. 7, both inoculated with Stefansky's bacilli.

SUMMARY OF CHARACTERISTICS OF THE CULTURES

Yellow strain, stained by Ziehl, showed median size bacilli, stained by Fontes, showed typical bacilli in its major parts with rose cytoplasm, with dark-blue nodules; its fluorescence was moderately positive and Dubos test negative. The white strain, R type, is strongly acid-fast and Gram positive. Stained by Fontes showed all classical forms of mycobacteria. Its fluoroscopy was as strong as the most virulent Koch's bacillus. Also its Dubos test was strongly positive. Both new strains of mycobacteria were inoculated in various batches of murines, of which some have been already studied, bacteriologically and histopathologically, and others are under observation.

Wrote in Athens, Greece, August, 20th, 1953.

Nova Espécie de Ouriço do Mar: Cassidulus mitis, Ordem Cassiduloida, Echinoidea, Capturado na Baía de Sepetiba

por

Luiza Krau

(Com 6 estampas)

A presente publicação trata de um exemplar de um pequeno ouriço do mar, em feitio de caroço de manga, capturado na Baia de Sepetiba. O que chamou logo a atenção foi este pequeno ouriço ser um representante ainda vivo de *Cassiduloida*, ordem de equinodermas, cuja maioria das espécies já foi extinta ha várias épocas geológicas.

Uma nova espécie de *Cassidulus* tem importância zoogeográfica, talvez possa vir a ser interêsse em paleontologia, caso a nova espécie *mitis* venha a cair em sinonimia com algum fóssil.

O estudo das espécies não fósseis do gênero *Cassidulus* é encontrado na magnífica monografia de Mortensen, volume IV, pág. 190. Baseando-nos nos dados expostos por esta grande autoridade em equinodermas, podemos apresentar a posição do novo *Cassidulus mitis*, entre as espécies existentes.

CHAVE DO GÊNERO *CASSIDULUS*, PARA AS ESPÉCIES RECENTES, MOSTRANDO A POSIÇÃO SISTEMÁTICA DA NOVA ESPÉCIE *MITIS*

1 — Carapaça achatada, isto é: relação de altura dividida por comprimento de 0,56 até 0.42 — 2.

1 * — Carapaça alta, isto é: relação de altura desde 0,56 até 0,64 — 3.

2 — Espaço esternal (ou extremidade adoral do 5.° espaço inter-ambulacral) ornamentado com entalhes grandes, de 0,5 mm. até 1 mm. cada, ovóides e lobiformes, com 26 entalhes por 10 mm²; sistema apical iniciando-se mais próximo ao centro, isto é, a 3/8 do comprimento do animal. Os lados da carapaça se levantam íngremes, e depois em curva abaulada até ao ápice, conforme as figuras 4 e 21. Bôca começa mais central, isto é, a 0,24 do bordo anterior da face oral. Pétalas mais curvas e mais convexas. Poros interno e externos conjugados por uma fenda, às vêzes em forma de V. Periprocto de 16 placas, disposto seg. a fig. 10 — *Cassidulus mitis* nova espécie.

2 * — Espaço esternal ornamentado com entalhes grandes (relativamente grandes para o tamanho do animal) de 0,2 a 1,2 mm. cada, ovóides e lobiformes, de 10 a 20 entalhes por placa (35 entalhes por 10 mm² seg. Mortensen fig. 179) sistema apical iniciando-se mais longe do centro, a 1/3 do comprimento do animal. Feitio da carapaça diferente, seg. fig. 22. A bôca começa a 0,36 do bordo anterior da face oral. Pétalas quase retas, mais em forma de fita, e mais paralelas. Poros externos e internos das

pétalas não conjugados, cada poro é um furo separado e independente. Periprocto com numerosas placas, isto é, mais de 100. — *Cassidulus caribaearum* Lamarck. (Fósseis dos terrenos terciários (plioceno), e até hoje vivos, no Atlântico (Antilhas).

3 — entalhes pequenos 4

3 * — entalhes grandes 5

4 — Ornamentação do 5.° inter-ambulacro com entalhes pequenos, de 0,1 mm cada um, sendo 50 ou 60 por placa, ou 13 entalhes por 10 mm². São redondo e punctiformes. Relação de altura = 0,64. Pétalas com 2 a 4 grandes tubérculos primários inter-placas, e 3 ou 4 tubérculos interporíferos pequenos. — *Cassidulus pacificus* (Agassiz). Do oceano Pacífico, vivos, atuais, (fig. 23).

4 * — 26 entalhes por placa. Relação de altura = 0,56. Pétalas com os grandes tubérculos primários em número de um ou dois, e 2 a 3 tubérculos inter-porifeiros pequenos — *Cassidulus eugeniae* Lovén. (Encontrada em Galapos). Fig. 25.

5 — Ornamentações do 5.° espaço semelhantes as de *C. caribaearum*. Sistema apical mais próximo ao bordo anterior, os lados da carapaça se levantam íngremes até ao ápice. Relação de altura = 0,58 — *Cassidulus infidus* Lovén (Estado da Bahia) Fig. 24.

É hipótese aceita as espécies dos *Cassidulidae* terem aparecido no período cretáceo (senoniano), muito desenvolvidas no eoceno; com o correr dos tempos terciários foram diminuindo, tendo atualmente no quaternário a maioria desaparecido. O gênero *Cassidulus* permanece hoje entre quatro gêneros ainda não extintos. Conta certamente 3 espécies recentes, bem definidas, possivelmente com 4 espécies recentes (se o *Cassidulus eugeniae* fôr considerada espécie válida, dependente de estudos mais aprofundados dos atuais). Se as autoridades no assunto considerarem estas 4 espécies recentes válidas, nós proporemos a nossa *mitis* como a 5ª espécie recente. (Também isto dependerá da diagnose do gênero *Cassidulus*, que às vêzes se extende mais para alcançar formas de Rhyncopygus ou até se confinar com Rhyncolampas, ou mesmo pela criação de um novo gênero. A espécie *Cassidulus infidus*, segundo Mortensen, talvez poderia caber em um outro gênero a ser desdobrado de *Cassidulus*, após maiores estudos.

Enfim, na situação atual da sistemática, esta é a apresentação da 5ª espécie recente. Fazemos a descrição pelo exemplar único colhido, e mesmo aconteceu que êste delicadíssimo animal quebrou-se. Também notemos que os *Cassidulus* dos museus de todo o mundo são poucos, raros, frágeis e quebradiços, resultando várias descrições serem baseadas em fragmentos, e não sòmente de fósseis, como de animais recentes; haja visto as descrições de *C. eugeniae* e de *C. infidus*.

O animal encontrado por nós apresenta a disposição compacta do sistema apical, e o periprocto diretamente aboral, que são altamente especializadas nos animais que já vieram a existir desde o período cretáceo, não tendo na sua morfologia outras formações existentes nos equinodermas que vieram surgir em épocas geológicas posteriores ao terciário. Na sistemática do difícil grupo da família *Cassidulidae*, os autores muitas vêzes não chegam a um acôrdo unânime, por dificuldades insuperáveis. Embora um fóssil possa ser determinado com tanta precisão quanto um animal recente, é obstáculo invencível a falta de fragmentos que trariam os caracteres importantes.

Cassidulus mitis Nova espécie

(Estampa 1 a 6; fig. 1 — 21)

Descrição — Vista abactinal: a carapaça vista por cima apresenta o âmbito ovóide pentagonal (fig. 1); âmbito anterior achatado, seguindo dois âmbitos laterais pouco divergentes, quase simétricos bilateralmente, depois dois âmbitos posteriores, em arco, que se encontram atrás e próximo ao sulco anal. A pétala anterior se dirige para o meio do âmbito anterior e a II pétala se dirige aproximadamente para o meio do âmbito antero-direito, sendo deslocada de 13.° para a esquerda do eixo de simetria bilateral, que se vê liso na face oral.

O ramo posterior da pétala antero esquerda vai em direção ao têrço anterior do âmbito antero-esquerdo, sòmente em metade do comprimento, onde depois quebra-se e dirige-se para a esquerda totalmente. O ramo posterior acompanha de modo semelhante o que faz o ramo anterior. A pétala postero-esquerda vem em direção ao têrço posterior do âmbito látero-posterior, fica a igual distância da fenda anal que a pétala póstero-direita, que é aproximadamente bilateralmente simétrica com a sua par. Note-se que a pétala póstero-esquerda é pouco mais estreita e pouco mais comprida, pouco menos convexa que a sua par.

A pétala póstero-direita mais convexa, mais curta, e mais larga (Na fotografia da figura 1 o zoologista entendido na especialidade terá que descontar a torsão de 12.° para a esquerda que sofreu o fragmento anal ao ser fotografado).

Vista Direita: vendo-se o animal pela direita obtém-se a silhueta apresentada na figura 3: vê-se a base um pouco convexa, e os espinhos maiores mais eriçados passam dirigidos para traz, e são mais altos que os correspondentes vistos pela esquerda (fig. 4), sendo o contôrno basal mais reto, direita, o animal é de aspecto mais bojudo, mais globoso, na vista lateral esquerda o animal é mais esbelto (compare as fotografias 3 e 4). Na silhueta da figura 21 o animal está em vista esquerda. O vértice fica sempre horizontal, não há coincidência da bôca com o ápice, que não ficam no mesmo plano.

Vista Actinal: (fig. 2) — a face actinal é quase plana, muito pouco convexa, com os espinhos dispostos em linhas paralelas, ovóides, concêntricas, dirigidas da parte anterior para a posterior. Os maiores espinhos são de 3 a 4 mm. de comprimento, êstes se encontram em uma longa faixa central longitudinal núa, de 2,5 mm de largura, que se extende de uma a outra extremidade da carapaça. O peristoma pentagonal está a 18 mm. do polo anterior, tem 2,2 mm. de comprimento, por 3,5 mm. de largura máxima.

Ambulacra: Poros das pétalas conjugados, sendo em regra os de um lado arredondados, e, se unem com os do lado oposto por uma fenda. Os que são arredondados são mais largos que os em fenda.

Zona Interporífera: (fig. 18). A zona interporífera apresenta a seguinte tuberculação: dois tubérculos interporíferos, e mais dois tubérculos inter-placas, dando ao todo geralmente 4 tubérculos. Às vêzes, ao todo 3 tubérculos, sendo um interporífero e 2 inter-placas; ou vice-versa: um inter-placas e 2 interporíferos.

Ambulacra Petalóides — Pétalas do trívio: pétala, ou pétala anterior: foliácea, aberta distalmente, sendo distalmente com os dois ramos paralelos e não chegando até a margem. O seu ramo esquerdo inicia-se na I placa ocular na direção do poro genital antero-esquerdo, mas na mesma altura que o poro genital antero-direito (fig. 7, 8 e 9). Os seus primeiros poros são simples, os 4º e 5º poros são conjugados, formam uma fenda em linha reta que vai ter em direção perpendicular ao âmbito látero-direito do animal;

6.°, 7.°, 8.° e 9.° poros são cada qual maior que o outro, tem as fendas ligeiramente em V, depois do 10.° em diante vão regularmente até ao 26.° poro. O ramo ântero-direito quando vista pòr fora parece começar mais anteriormente que o ramo oposto, e começar logo por poros conjugados. O aspecto desta pétala vê-se (na fig. 1) e (III, fig. 8), (III, fig. 9).

IV pétala, do trívio (pétala ântero-esquerda) — Na IV placa ocular seus dois ramos começam pouco à esquerda e atrás do povo genital ântero-esquerdo (A, fig. 7); o ramo anterior é pouco mais reto que o ramo posterior, que é mais arqueado (II, fig. 8); seguem assim até 2/3 da pétala depois se curvam, ou melhor, quebram-se bruscamente, ao nível do 12.° ao 14.° poros. Daí seguem uma direção perpendicular ao âmbito látero-esquerdo, nesta direção contam-se mais 4 poros. O ramo posterior tem as fendas mais largas e tem os poros maiores que os correspondentes no ramo anterior.

II pétala, do trívio, (pétala ântero-direita). A II placa ocular começa pouco atrás do poro genital ântero-direito (B, fig. 7), (II, fig. 8, II, fig. 9) o seu ramo anterior é menor recurvado que o ramo posterior (fig. 1). As fendas do ramo posterior são maiores e mais largas, tem 25 poros, sendo os mais largos do 9.° ao 19.° poros.

Pétalas do bívio: pétala esquerda do bívio (V pétala): ou pétala póstero-esquerda; começa um pouco abaixo, na V placa ocular, para traz, e um pouco à direita do poro genital póstero-esquerdo (C, fig. 7). A pétala é lanceolada mais regularmente que tôdas as outras, e o seu ramo esquerdo tem as fendas muito mais largas que as do ramo direito (fig. 8, V). Os poros do ramo esquerdo vão aumentando regularmente do 1.° ao 14.° e são todos conjugados por uma fenda quase em linha reta. Os poros do ramo direito: 1.° ao 8.° poros são pequenos e seguem uma direção; do 9.° poro em diante a fenda dos poros muda de direção, são gradativamente maiores, mas são sempre mais estreitos que os poros correspondente do ramo oposto.

Pétala direita do bívio, ou pétala póstero-direita, ou I pétala: nasce na V placa ocular à esquerda e pouco abaixo do poro genital póstero-direito (D, fig. 7); seus ramos são lanceolados e abertos. Os poros conjugados do ramo esquerdo são menores que os correspondentes do ramo oposto.

Pétalas vistas pela face interna: Os 4 poros genitais e as cinco pétalas são, quando vistas pela face interna, muito mais regulares, e o aspecto apresentamos na figura 16. Nesta figura também vemos as placas inter-ambulacrais, que apresentam uma disposição muito irregular e muito peculiar desta nova espécie que estamos descrevendo.

Sistema Apical — As placas genitais são mergulhadas na madreporita. O sistema apical é de porte pequeno (mas pouco maior que o de *C. caribaearum*, fig. 22, bem maior que o *C. eugeniae*, fig. 25; regula ter o mesmo porte que o de *C. infidus*).

É localizado na parte anterior da carapaça, dista do polo anterior 0,37 do comprimento do animal. Isto é, distância do poro genital ântero-direito

ao pólo anterior do animal = 1,37 mm.). Os poros genitais são em número de 4 (figs. 1, 7, 8, 9 e 16). A disposição muito particular da nova espécie *Cassidulus mitis* é explicada fàcilmente com auxílio da fig. 7. Tomemos:

A — poro genital ântero-esquerdo,
B — poro genital ântero-direito,
C — poro genital póstero-esquerdo,
D — poro genital póstero-direito.

Medindo as distâncias encontramos:

de A até B = 1,5 mm.
de A até B = 1,5 mm.
de B até D = 2,77 mm.
de C até D = 2,98 mm.
de C até A = 1,85 mm.

Medindo os ângulos encontramos:

Ângulo ABD = 68.°; BDC = 77.°; DCA = 62.°; CAB = 154.°.

Vê-se que os poros formam um quadrilátero irregular, tendo mais avançado o poro ântero direito, e os 2 poros posteriores estão aproximadamente na mesma altura.

Observando (fig. 9) veremos que o poro genital ântero direito é o maior, e é ovóide no sentido sagital; os 2 poros posteriores são de mesmo tamanho e circulares; o menor é o poro ântero esquerdo que é alongado sagitalmente. A zona apical é regularmente ornamentada de tubérculos circulares, de 0,21 até 0,28 mm de diâmetro.

Placa madrepórica — No sistema apical vê-se a placa madrepórica, grande, compacta, irregular. A área entre os 4 poros genitais está coberta por hidróporos madrepóricos cuja disposição está apresentada na fig. 9.

São irregularmente espalhados, às vêzes 9 ou 10 hidróporos formam um círculo, outras vêzes 4 ou 5 em pequenas cadeias formando um arco; outras vêzes seguem linhas irregulares 3, 4 ou mais hidróporos.

Placas oculares — São em número de 5, nós as assinalamos em branco na fotografia da figura 8. A placa anterior, ou III placa, fica situada mais profundamente em uma depressão, é grande e em forma de meia-lua. Sua direção é oblíqua.

A IV placa ocular fica ao lado do poro genital ântero-esquerdo, é de forma alongada, riniforme irregular, fica em direção sagital com o poro genital póstero-esquerdo. II placa — um pouco mais para fora da linha que une os poros genitais da direita, é alongada e largamente curvada em forma de C. As I e V placas oculares são de mesmo tamanho que a II e ambas são colocadas pouco atrás e para dentro dos 2 poros genitais posteriores (fig. 8). Note-se que a I placa é colocada pouco mais anteriormente, e mais recurva para traz que a sua par.

Flósculo e Actinóstoma — As extremidades adorais dos interambúlacros formam borráinas, que são em número de cinco; os filódios e

as borrainas formam um flósculo típico e bem desenvolvido. O actinóstoma apresenta o seguinte aspecto em vista externa (fig. 11): o peristoma, ou contôrno onde se insere a membrana bucal, é pentagonal; membrana bucal mole, tendo uma parte actinal junto à inserção pentagonal, com espículas menos lobuladas, e uma parte mais central, arredondada onde está a abertura bucal (espículas na fig. 15). Os 5 filódios estão marcados respectivamente I, II, III, IV e V nas figuras 11 e 12. Entre êstes filódios, nos espaços inter-ambulacrais, encontramos formações cheias de numerosos tubérculos pequeninos, formando dobras — as borrainas (DEBRUM = BOURRELLETS = = BORRAINAS). Estas borraínas são em número de 5, sendo duas anteriores, uma à direita outra à esquerda do III filódio. Estas duas borrainas são sub-iguais, sub-simétricas, e são as maiores. Posteriormente ao III filódio, no eixo de simetria bilateral do animal, está a borraina posterior que se continua bruscamente com uma superfície lobulada irregularmente, o 5.º espaço inter-ambulacral, na parte adoral, e é onde estão ornamentos com entalhes em baixo relêvo, sem espinhos, e é o chamado «espaço esternal nú» por vários autores, existente em animais do gênero *Cassidulus* (fig. 11, entre I e V: «entalhes»). Há mais duas borrainas pequenas: a póstero-direita, que é trapezoidal, e a póstero-esquerda que é sub-retangular. Entre as 5 borraínas encontram-se 5 placas peristomiais dos filódios, tôdas elas, nesta espécie, apresentando 2 poros em uma única placa, em vista externa. A bôca do animal, em vista interna: fig. 12 — as 5 borrainas correspondem no lado de dentro a 5 placas peristomiais inter-ambulacrais, e há entre elas, 5 grupos de placas filodiais duas a duas, mas tendo, em vista interna, um poro sòmente para cada placa filodial.

PERIPROCTO — O animal em vista posterior, figura 6, apresenta a região anal situada em uma depressão que está localizada a 6,6 mm. da base, tem 3,4 mm. de altura e 6 mm. de largura. Na parte de cima da área anal percebe-se um arco bem nítido, onde são implantados vários espinhos formando uma franja; êstes espinhos chegam a ter 2 mm. de comprimento, e são aparados mais ou menos em linha horizontal. A parte inferior da área anal é mais plana, sendo em arco distalmente. É uma fenda em forma de lente convexa, transversal. A abertura anal é protegida por uma membrana, que foi recoberta, na parte interior, por uma série de placas poligonais, que são vistas e estudadas quando quebra-se o animal e examina-se em vista interna.

A disposição das placas do periprocto é muito peculiar em *Cassidulus mitis*, e acha-se na figura 10, em vista interna.

Membrana do periprocto, em vista interna, em forma de um escudo, com 16 placas, sendo 5 anteriores: a 1.ª placa anterior é paralelogrâmica, as 2.ª e 3.ª são pentagonais; sendo a 2.ª a mais estreitada, e a 3.ª é a maior em área; as 4.ª, 5.ª e 2.ª aproximadamente de mesma altura; a 5.ª de mesma largura que a 1.ª. Há 3 placas medianas grandes, e, sôbre a 3.ª placa mediana vemos 2 placas pequenas ântero-medianas. Há 2 placas laterais direitas e 3 placas laterais esquerdas. Duas placas posteriores grandes. O feitio do periprocto é apresentado na fig. 10.

O seu eixo de simetria bilateral é inclinado para a esquerda, vem da 2.ª ponta da 3.ª placa anterior até ao sulco que separa as duas placas posteriores.

Espículas — membrana bucal de abertura circular, tendo espículas espalhadas (fig. 15). As espículas são mais reunidas mais próximo da abertura bucal, onde apresentam 1 a 3 furos arredondados e até 10 ou 13 lobos; mais para o meio as espículas não tem furos, e tem 6 a 8 lobos. Proximalmente, junto à inserção da membrana actinal com o peristoma, as espículas tem geralmente 3 a 6 lobos, e às vêzes apenas 1 a 2 lobos.

Pedicelárias — Pedicelária tridentada (fig. 20): são relativamente pequenas, tem 0,35 mm. de comprimento e na base 0,18 mm. de largura. As 3 peças são dentadas, sendo as dentações tôdas de mesma fundura, não havendo dentes excessivamente mais longos. Pedicelária *ophicephala* conforme as figs. 19 A e B, de 0,15 de comprimento, e a largura máxima na parte distal, com 0,11 mm. e com dentações de tamanho desigual. As pedicelárias trifilosas são muito pequenas.

Medidas: Comprimento: 37,2 mm; largura máxima: 29,4 mm; altura: 16,2 mm. Poros genitais, do ântero-esquerdo ao ântero-direito — 16 mm; do ântero-esquerdo ao póstero-esquerdo: 22 mm. Do póstero-direito ao póstero-esquerdo — 31 mm. Do ântero-direito ao póstero-direito — 28 mm.

Côr — o único exemplar estava branco, em álcool.

Material — Um único exemplar Cat. n.º 3.513 da Estação de Hidrobiologia, e lâminas n.º 3.513-A.

Local — Capturado pela senhorita Maria Isaura Peréz Carnota, quando aluna do Curso de Hidrobiologia do Instituto Oswaldo Cruz. Águas razas, Itaguaí, 14 de setembro de 1952 (Baía de Sepetiba, Lat. 22° 55', Long. 43° 48' W. Greenw; Informação de coordenadas tiradas da carta 1.609 do M. Marinha).

DISCUSSÃO

O *Cassidulus mitis* n. sp. fica no mesmo grupo dos *Cassidulus* de carapaça chata que o *C. caribaearum* Lamarck. Daremos então alguns caracteres para diferenciá-lo melhor do *C. mitis*. O *Cassidulus cariaearum* Lam. (fig. 22) tem a carapaça baixa, relação altura por comprimento de 0,42, de forma oval, às vêzes mais alargada posteriormente e arredondada em ambas as extremidades.

O ambúlacro apresenta os poros das pétalas pequenos e arredondados e aproximadamente todos do mesmo tamanho, não são conjugados. A zona interporifera carrega um ou dois tubérculos interporíferos, grandes, e nas interplacas 1 a 2 tubérculos, ainda maiores, sendo 3 a 4 o total de tubérculos por placa.

As séries dos poros das pétalas pares posteriores são de desigual comprimento: as séries externas tem 3 — 7 poros mais que as séries internas.

O periprocto, em vista interna é totalmente diverso do de *C. mitis*. Na espécie *C. caribaearum* Lam. o periprocto internamente tem a forma de um triângulo equilátero esférico; a disposição das placas é diversa: (seg. a fig. 181, pág. 208, Mortensen): são em número de cêrca de 200 placas, sendo 14 as placas grandes: 1 placa posterior, 3 laterais direitas, 3 laterais esquerdas, 7 medianas, e 65 pequenas placas ântero-medianas, e mais de uma centena de pequeninas placas anteriores.

O maior exemplar de *C. caribaearum* mede 31 mm. de comprimento (Mortensen, Museu de Estocolmo); os de H. L. Clark 1925 tem 27 mm., e os mais comuns segundo Mortensen são os de 22 mm. até 25 mm. O mais comum tem de comprimento 22 mm., altura, 10 mm., largura: 17,8 mm.

A nossa espécie *mitis* é bem maior, tem 37,2 mm. de comprimento. A espécie *C. caribaearum* ocorre em águas razas, litorâneas, nas Antilhas, Bahamas, até Barbados seg. MORTENSEN, e na Flórida seg. AGASSIZ até 197 mm. de sonda. Assim damos caracteres que compilamos das monografias de AGASSIZ e de MORTENSEN, e que poderão servir para se reconhecer a espécie *C. caribaearum* caso ela venha a ser encontrada em águas do litoral do Brasil — o que até certo ponto não poderá ser suspeito muito impossível, devido às numerosas espécies de animais marinhos das Antilhas e Flórida se estenderem zoogeogràficamente até ao Brasil.

Os fósseis de *C. caribaearum* vão até as épocas pliocenas dos terrenos terciários (era cenozóica).

Parece provável que os animais vivos sejam de côr violácea; pelo menos, quando fixados êles são violáceos.

Outra espécie encontrada no Oceano Atlântico foi o *Cassidulus infidus* (fig. 24). Visto de lado êle é alto, sua relação comprimento por altura é 0,58. A base é feta horizontal, sua curvatura bem convexa. Visto por cima o seu contôrno é bem diverso: anteriormente em arco fechado (como se tivesse um centro de circunferência no sistema apical); lateralmente há arcos com grande raio, muito simétricos; é achatado posteriormente. Ao contrário de *mitis* que é pontudo posterior e chato anteriormente, êste *C. infidus* é arredondado anteriormente e mais pontudo posteriormente. Periprocto estreito e em fenda.

O único espécime existente foi capturado no litoral do Estado da Bahia por HJORT; seus fragmentos acham-se no Museu de Estocolmo; foi denominado por LOVÉN de *C. infidus*, não foi descrito originalmente por êste autor, mas num estudo que apareceu em 1948 feito por MORTENSEN.

Temos outros meios de reconhecer esta espécie e de diferenciá-la do *C. mitis*. Chamamos ainda a atenção para as seguintes diferenças bem marcantes entre estas 2 espécies: O sistema apical de *C. mitis* não fica tão próximo à extremidade como no *C. infidus*.

As pétalas de *C. mitis* ocupam área menor. A depressão do periprocto de *C. mitis* é bem mais funda e bem mais abaixo dos ramos das pétalas posteriores. No *C. infidus* a depressão do periprocto é mais anteriormente colocada, e fica entre os ramos das pétalas. fig. 24).

Quanto aos outros dois cassidulus que são do Oceano Pacífico:

Não houve descrição original de *C. eugeniae*, houve uma referência a fragmentos dados na figura de um filódio e de uma região apical, por LOVÉN. Mais tarde, baseado nestas indicações fragmentárias MORTENSEN pôde fazer um estudo maior desta espécie, examinou o material do Museu de Estocolmo onde o tipo *C. eugeniae* foi depositado. Mas apesar disto a espécie não foi ainda descrita, separadamente, é apenas referida na monografia de MORTENSEN.

Uma pequena descrição poderá ser feita baseada nos dados de MORTENSEN. A figura da parte adoral do V ambúlacro, segundo LOVÉN (pl. VII, n.º 66) difere ligeiramente no arranjo dos poros da fig. 187 de MORTENSEN. Segundo WESTERGREEN a figura de LOVÉN foi tirada do espécime tipo, que estava inteiro em 1874, e que agora encontra-se fragmentado. A pequena diferença entre as figuras de LOVÉN e de MORTENSEN ocorreu por conta da fragmentação do animal, pois o desenho de MORTENSEN só pôde ser feito baseado nos fragmentos.

De qualquer modo, o que está evidente em ambas as figuras é o seguinte: A carapaça de *C. eugeniae* é alta, seu formato lembra o de *C. pacificus*, o que levou MORTENSEN o pensar que fôssem uma mesma espécie. Mas uma observação mais atenta e mais demorada mostrou no entanto que o *C. eugeniae* apresentava dois caracteres bem marcantes que o diferenciavam de *pacificus:* os entalhes inter-ambúlacro posterior são muito maiores que os de *pacificus* (figs. 185, 186, 187 de MORTENSEN). As séries de poros das pétalas aproximadamente do mesmo comprimento, o que não acontece em *pacificus*. Se depois êstes caracteres forem considerados específicos *eugeniae* será considerada espécie válida. Se após um estudo mais apurado de *pacificus* talvez possa vir a ser constatado que *eugeniae* seja apenas uma modificação ou variação morfológica dêste. (Por enquanto os espécimes de *C. pacificus* não dão para estudos de variações).

O Professor MORTENSEN pediu ao Professor H. L. CLARK que examinasse os seus espécimes de *Cassidulus* capturados em Galapos e os da costa do México, e CLARK respondeu que não havia encontrado diferença notável entre seus exemplares de *C. pacificus* apanhados em Galapos e apanhados no México, e, que as relações morfológicas não estavam em correlação com localidade. CLARK disse que no seu material só havia uma espécie: *C. pacificus*.

Os tipos existentes são dois exemplares do Museu de Estocolmo — 1 inteiro e nú, sem espinhos (em 1874) e outro menor já fragmentado em 1874, rotulados «Galapos» «Expedição Eugênia». São os únicos existentes até hoje.

O *Cassidulus pacificus* que tem sido encontrado no Oceano Pacífico, em águas superficiais até 27 metros de fundo, na Califórnia, Cabo de São Lucas, Panamá, Galapos, Ilhas Três Marias, (MORTENSEN) se diferencia por vários outros caracteres. Sua carapaça (fig. 23) é alta, ovóide ligeiramente achatada posteriormente, e arredondada anteriormente. Os entalhes do 5.° inter-ambúlacro são muito pequenos. O ambúlacro apresenta os poros das pétalas desiguais, os poros externos algumas vêzes alongados de cêrca de 2 vêzes o tamanho do poro redondo interno. Zona interporífera coberta de pequenos tubérculos primários, cêrca de 3 a 4 e as interplacas carregam 2 a 3 tubérculos grandes. Zonas poríferas igualmente desenvolvidas em tôdas as pétalas, exceto as da zona posterior, do par de pétalas posterior, onde são muito mais curtas que as da zona anterior. Há coincidência do vertex e do sistema apical (o que não ocorre em *C. mitis*). As pétalas de *C. pacificus* são regularmente lanceoladas. O sistema apical de *C. pacificus* forma um trapézio regular com os 4 poros genitais. O periprocto tem uma disposição de placas internas muito diversa: As placas se dispõem transversalmente e tomam a forma de um crescente, apresentando uma fileira posterior de 4 grandes placas poligonais e uma segunda fileira com 5 ou 6 placas menores (medianas). Depois uma fileira de placas pequeninas e irregulares no bordo.

Os *Cassidulus pacificus* são grandes, quase duas vêzes maiores que o *mitis*, chegam a 70 mm. de comprimento segundo H. L. CLARK; mas o tamanho mais comum segundo MORTENSEN é o de 50 mm. São de côr esverdeada quando vivos.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

ESTAMPA I — *Cassidulus mitis* nova espécie.

Fig. 1 — Vista por cima. O contôrno que se vê nesta vista tem o nome técnico de AMBITUS. Aumentado de 2,12 vêzes. (Descontar 12.° para a direita de torsão no fragmento anal).

Fig. 2 — Vista por baixo. Aumentado de 1,8 vêzes.

Fig. 3 — Vista pela direita. Aumentado de 1,8 vêzes.

Fig. 4 — Vista pela esquerda. Aumentado de 1,8 vêzes.

Microfotografias de Gerson Durend.

ESTAMPA II — *Cassidulus mitis* nova espécie.

Fig. 5 — Vista anterior.

Fig. 6 — Vista posterior.

Fig. 7 — Ápice, aumentado de 8,5 vêzes. Aspecto das pétalas e da tuberculação. A = poro genital ântero-esquerdo; B = Poro genital ântero-direito; C e D = poros genitais posteriores.

ESTAMPA III — *Cassidulus mitis* nova espécie.

II, III, IV as 3 pétalas do trívio. I e V: as pétalas do bívio.

Firg. 8 — Região apical, aumento 6,4 vêzes. As 5 placas oculares foram focalizadas, e foram desenhadas por cima com tinta branca. Vêm-se os 4 poros genitais.

Fig. 9 — Sistema apical; aumento de 13,8 vêzes. Os poros genitais bem focalizados; o início das pétalas nas placas oculares. A placa madrepórica com os hidróporos bem visíveis.

Estampa vi — *Cassidulus mitis* nova espécie.

Estampa v — Fig. 15. Espículas da membrana bucal; para baixo a membrana bucal, para cima está o lado do perístoma, com a inserção.

Fig. 16 — Zona apical, em vista interna os 4 poros genitais, as 5 pétalas vistas por dentro, e a disposição das placas interambulacrais.

Fig. 17 — pedicelária.

Fig. 18 — zona interporífera com 1 a 2 tubérculos inter-poros, e dois tubérculos interplacas.

Fig. 19 — pedicelária *ophicephala*.

Fig. 20 — pedicelária tridentada.

Estampa vi — Os animais atuais de gênero *Cassidulus*.

As formas das várias espécies foram reduzidas ao mesmo tamanho, para que possam ser comparáveis mais fàcilmente.

Fig. 21 — original da nova espécie que estamos descrevendo.

As figuras 22 até 25 foram compiladas das figuras e fotografias das monografias de Mortensen e de Agassiz.

BIBLIOGRAFIA

Th. Mortensen

1948. A Monograph of the *Echinoidea*. Vol. IV. *Holectypoida Cassiduloida*. Copenhague.

Al. Agassiz

1872-1873. Revision of the *Echini* Illust. Cat. Mus. Comp. Zoolog. Havard College. Part I — IV e plates.

TRANSLATION

On a New Species of Recent Sea Urchin Cassidulus mitis, Order Cassiduloida, Echinoidea, Found on the Coast of Sepetiba Bay

The present paper calls attention to a small sea urchin found on the coast of Sepetiba bay. It is a specimen of the most perplexing order *Cassiduloida* with a considerable number of referred fossil species. A *Cassidulus* new species is zoogeographically important, and it may be paleontological significant if our *Mitis* species is identical to some fossil.

The recent species of *Echinoidea* we find in the splendidous magnificent monograph of Mortensen. His family *Cassidulidae* (vol. IV, p. 190-217) therefore forms our starting pointing of *Cassidulus* systematic echinology.

We discuss and we separate the *Cassidulus mitis* from the rest of species of genus, in the compiled following key, so that we may sum up the characters as described by MORTENSEN.

SYSTEMATIC DIAGNOSIS OF THE SPECIES *MITIS* BASED ON A KEY TO THE RECENT SPECIES OF THE GENUS *CASSIDULUS*

1 — Test very low (that is: height being divided by length — 0.56 to 0.42) — 2.

1 * — Test high (that is: height divided by length — 0.56 to 0.64) — 3.

2 — Pits naked sternal space: 0.5 to 1.0 mm. sized, oval lobulated pits; 26 pits per 10 square mm. Apical system placed more centrally (that is: situated in 3/8 of length of animal). Less central position of the mouth (that is: situated in 0.24 of length of animal). Conjugate ambulacral pores. Petals somewhat curved. Aspect after fig. 1 — 21.16 — plates periproct. — *Cassidulus mitis* n. sp. fig. 21.

2 * — Oval and lobate pits 0.2 to 1.0 mm. sized, and 35 pits per 10 sp. mm.
2 * — Oval and lobate pits 0.2 to 1.0 mm. sized, and 35 pits per 10 sp. mm. (according with fig. 179 of MORTENSEN : 42 pits per 12 mm²). 10 to 20 pits in every plate. Apical system far the center of the test (that is : at a distance of 1/3 of test length are the apical plates). More central position of the mouth, it is at a distance of 0.36 test length. The pores are not conjugated. Petal more parallel shaped than those of mitis. Aspect and profile after sketch fig. 22. Periproct with numerous plates (more than 100, after fig. 181 of MORTENSEN). — *Cassidulus caribearum* Lamark.

3 — pits small 4
pits large 5

4 — Pits of naked sternal space very small. (Every one about 0.1 mm. length.). 13 pits per 10 sq. mm. 50 ou 60 pits in every plate. Pits rather punctiform circular. Height divided by length = 0.64. Petal with 2 or 3 primary tubercles, and 4 or 5 other tubercles. *Cassidulus pacificus* (AGASSIZ) fig. 23.

4 * — 26 pits in one plate. Petal with 2 primary tubercles and 2 others tubercles. Height divided by length = 0.56. — *Cassidulus eugeniae* LOVÉN. (fig. 25).

5 — Pits like or about like that of *C. caribaearum*. Height divided by length = 0.58. Apical system near anteriorly — *Cassidulus infidus* LOVÉN. (fig. 24).

Cassdulus mitis new especies

(Plate I to VI, fig. 1-21)

Abactinal view — AMBITUS : From above, the outline of the test is pentagonous oval; the anterior side is somewhat straightened; the two rather symmetrical antero lateral sides are slightly divergent; and the two postero lateral sides are bent and rounded near to the edges. The broader transversal diameter is in the 2/3 posterior of the test.

The two lateral inter-ambulacra — The I interambulacrum is as broad spaced as the IV. The two anterior : the right is wider than the middle of the anterior outline, its direction get just upon 13º to the left (II > III). The anterior petal (III petal) points nearly in direction of the symmetrical axis. (The symmetrical axis, in actinal view, is without spines — fig. 2). The two rows of pores of the III petal are parallel in distal half of their way. II petal in direction to the middle from the front right outline. The IV petal points to front left direction, as far as half

of its way, and toward it deflects to left. There are 6 mm from center at the bending, and 4 mm. from bending at the distal end of petal. The posterior petals are rather symmetrical. The I petal is shorter and more strongly convex than the V. (See the photo fig. 1, and deduce from 12.° out the break in the rather fragile test).

Right Side View — Seen in profile the base is almost convex (fig. 3). The right side spines are bristler bent to back than the left ones. (fig. 4: left side). The oral face is nearly flattened, from right side view the animal appears more inflated (fig. 3). The vertex contour and the base outline are just parallel and horizontal when they are seen from left profile. The apices and the mouth are not at all coincident at the same perpendicular plane. The apical system is in the vertex, which is horizontally placed and occupies 1/3 of length of animal.

Actinal View — Actinal surface nearly flat but rather convave, the spines ordered in concentric lineaments. Larger primary spines (3 to 4 mm. length) cross each other on a central longitudinal sternal surface, which is naked, and 2.5 mm. wide. The spines are turning backwards like the ones of the spantagoids, and the sternal naked surface divides the actinal face symmetrically. Pentagonal peristome placed about 18 mm. from the anterior pole (it is 2.2 mm. length, 3.5 mm. wide).

Ambulacra — The pores of the petals are conjugated. One row has rounded pores, joined to another by a furrow; the rounded pores are larger than the cleft ones which are somewhat elongated.

Interporiferous Zone — fig. 18 — The ridge between the consecutive pore pairs carries two tubercles, however the interporiferous zone is covered with two primary tubercles; sometimes there are 4, sometimes 3 tubercles disposed in the way — 2 primary and one single, or 1 primary and two single tubercles.

Ambulacra: Trivium petals: Unpaired petal tapering to a point at ocular plate which is its beggining place: the two series of suckers are not closed distally; the pores of the row *III*^{a} (right series) come to an end at 3 mm. beyond the ambitus; notwithstanding the left row terminates 2 mm. above the ambitus. The pores of 1, 2, and 3 petals are single and do no conjugate; 4 and 5 are cleft perpendicularly to the ambitus, and conjugate; the 6, 7, 8 and 9 pores are V shaped, furrowed and they become successively larger increasing proporcionally, and 10 to 26 are in regularly disposed sucession.

From above the right pore row is shorter than the left one. (fig. 1, and fig. 8: III; fig. 9: III).

Front left petal — Its ocular plate is on the left side and behind the left front genital pore (fig. 7-A). The anterior row of pores (series IV a) of the IV petal, near 2/3 tip extremity, is more or less straight in direction although the posterior row is convex (series IV b). Beyond 2/3 tip extremity distance, there is a corner placed on the 12 — 13 pores, that abruptly changes the directions, then, the row at 1/3 distal of petal points perpendicular to its ambitus, and we noticed 4 pores in this way.

The anterior row of pores of this ambulacrum stops 6.5 mm. at front of ambitus. On the opposite side the row stops only 4 mm. before the ambitus

and its pores are larger than that of anterior side. Front right petal (II petal) — Its ocular plate is behind the front right genital pore (fig. 7 — B) — fig. 8, 9. The front pore series is the most incurvate (fig. 1). The furrows of the posterior series are longer and broader than in the anterior row; this series has 25 pores and larger are the 9 and 10 pores. Left petal of bivium: the V ocular plate stands behind and to the right of the left back genital pore (fig. 7 — C) and fig. 8. This is the most regular lance-shape petal, but its left side has the furrow rows larger than that of right side. The 1st to 14th left pores increase by proportional progression and are conjugated by straight clefts. The 1 — 8 right pores (series Vb) are small and cleft pointing to lateral direction; the following furrows beyond 9th, pore are uniformly longer and more obliquely inclined, Right back petal (I petal of the bivium) — I ocular plate situated left and behind the back right genital pore (fig 7 — D), its series are lance-shaped and open.

Petals Internal Side — They are set regularly ranged (fig. 16).

Apical System: It is distinctly anterior, standing near the front pole and distant 0.37 of test length (That is: distance between the anterior pole and the front genital point right side = 1.37 mm.). The *Cassidulus mitis* specie's own arrangement is made intelligible with aid of fig. 7. Take for explaining purpose:

A — front left genital pore; B — front right genital pore; C — back left genital pore; D — Back right genital pore.

Measurements — Interval between the points A — B = 1.5 mm. B — D = 2.77 mm.; C — D = 2.98 mm.; C — A = 1.85 mm.

Protracting for laying down angles on paper, the genital pores were sketched: angle ABD = 68.°; angle DCA = 62.°; BDC = 77.°; CAB = 154°. The genital pores do not form a regular quadrilateral figure; forward is the front right pore, and the right posterior genital pore is by the side of the left posterior one. The longitudinally oval front right pore is the largest; the two orb shaped posterior pores are the same size; the left front pore is the smallest and axile stretched. The apical zone is covered regularly by 0.21 0.28 mm. diameter tubercles. The tuberculation is disposed uniformely in circunferences (fig. 9).

Madreporic Body — compact irregular and flat. The space covered with hydropores is sorrounded with the 4 genital pores, and its appearance is viewed on fig. 9. The madreporic minute holes are dispersely scattered: oftentimes 8 or 10 holes bound a circle, frequently 4 or 5 follow a curved line, sometimes 3 or 4 holes go in a linear direction. (Our figure of the 5 ocular plates, these are made specially conspicuous in the photography fig. 8, by white strokes of a brush.). The II ocular plate is situated through a sunken crescent depression; the knidey shaped IV plate is by the front left genital pore; the II, more or less C-shaped, rest a little toward the outside of an imaginary line that joins the two right genital pores. I and V are the same size, as II, both are behind and between the two posterior genital pores (fig. 8). Remark this I ocular is the most kidney shaped and it is more anteriorly situated than the fifth plate.

Actinostome and Peristome — (fig. 11, 12). Mouth pentagonal, the phyllodes, outside view fig. 11 and inside view fig. 12, are large; the anterior bourrelets, named the 3rd. and the 4th. are subequal subsymmetric and they are the largest. On the 5th interambulacrum there are the median size pits of naked sternal space, and we find 36 oval and lobate pits. 26 pits in an area of 10 square mm. Measurements — pits 0.5 to 1.0 mm length. The *C. mitis* pits are less than the *C. caribaearum* pits (according to the pits figured by Mortensen p. 208, fig. 179, with 35 in 10 sq. mm., or 10 — 20 pits by plate). The I and the IV are the smaller bourrelets, the IV has trapezoid configuration, and the I is like a sub-rectangle. The phyllodial peristomic plate has two holes in external view.

Mouth inside view (fig. 12) with 5 coupled two and two phyllodial plates, but one pore in every phyllodial plate, or two pores in coupled phyllodial plates.

Periproct (fig. 10) — The posterior view presents lenticular anal region (3.4 high, 6 mm. wide) situated in a sunken place 6.6 mm. distant at animal base. Upper anal area similar to an arch of vault with a spined fringe horizontally clipped (fig. 6) the spines of which are about 2 mm. long; the inferior portion of anal area is not so arched. At inside sight there are the periproct plates which are shown in fig. 10. The outline looks like a shield.

This periproct bears 16 plates, of which five are anteriorly placed. Counting up : 1 st. parallelogram anterior, the 2nd, and 3rd. pentagonous, the 2nd. the narrowest, and the 3rd. is the largest area; 4th. and 5th. same height as 2nd. and fifth as wide as the first; 3 median plates, and on the top of the 3rd. notice two small antero-median plates. Two big posterior plates.

The bilateral symmetry axis of this peristomic shield is deviated to left, its inclination comes from the extremity of the 3rd. anterior plate and it goes through the groove that divides the posterior plates and reaches its reentering end.

Spicules (fig. 15) — The spicules from the buccal membrane are less spreaded distally near the circular aperture of mouth, and the marginal ones exhibit 1 — 3 holes, and 10 — 13 lobulets; the 6 — 8 lobes spicules without holes are in the middle of actinal membrane. The spicules commonly 3 — 6, or sometimes 1 — 2 lobate, are close to peristomic insertion of actinal membrane.

Pedicellariae (fig. 20) — The tridentate ones, are relatively small (0.35 length, 0.18 mm. width at base), and they are furnished with sub-equal denticulate depressions, without immoderately big teeth. The ophicephalous (fig. 19 A, B are 0.15 by 0.11 mm.; the triphyllous pedicellariae are represented by very small types.

Measurements — Length of animal — 37.2 mm; Width — 29.4 mm; Heigth — 16.2 mm.

Color — The specimen preserved in alcohol is of a whitish ivory coloring.

Material Examined — The type, and only known specimen, Cat. n. 3.513 Hydrobiological Station of the Institut Oswaldo Cruz.

LUIZA KRAU — Nova espécie de *ECHINOIDEA Cassidulus mitis*

(Ordem *Cassiduloidea*)

ESTAMPA II

Fig. 5

5 mm.

Fig. 6

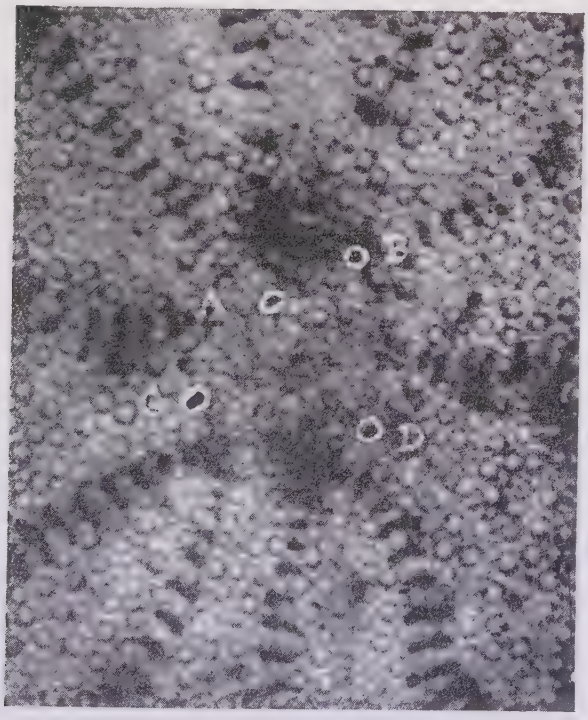


Fig. 7

3 mm.

LUIZA KRAU — Nova espécie de *ECHINOIDEA Cassidulus mitis*

(Ordem *Cassiduloidea*)

ESTAMPA III

fig. 8

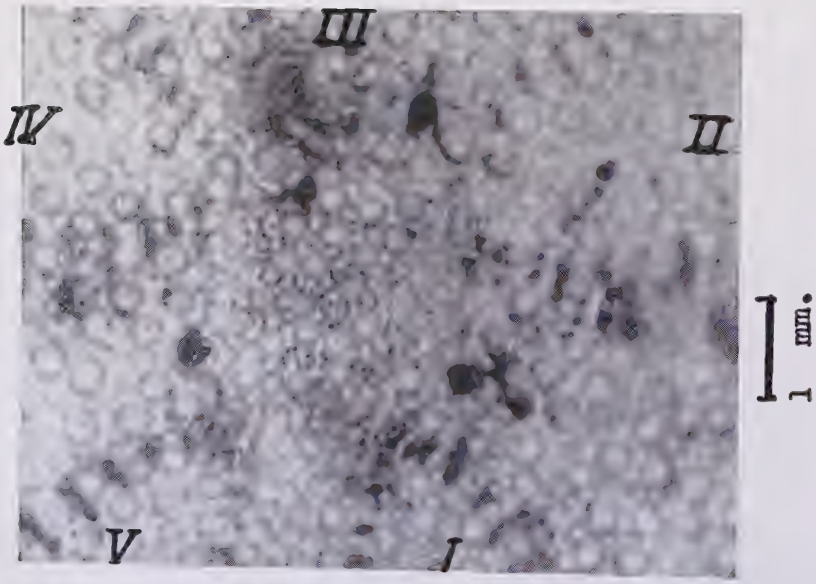
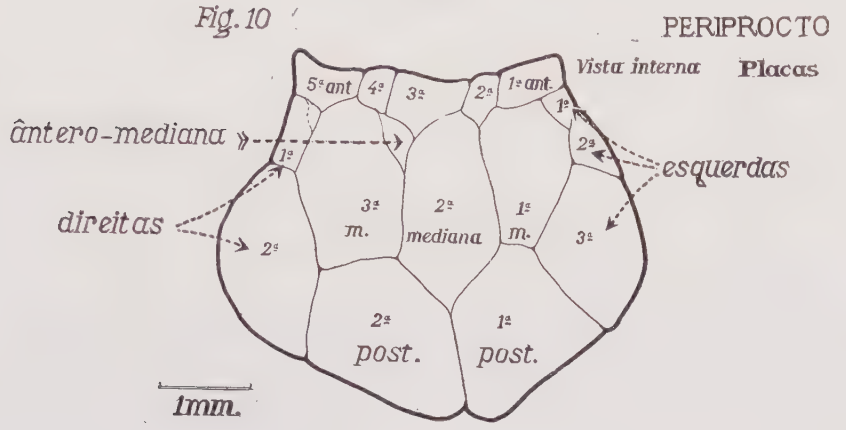


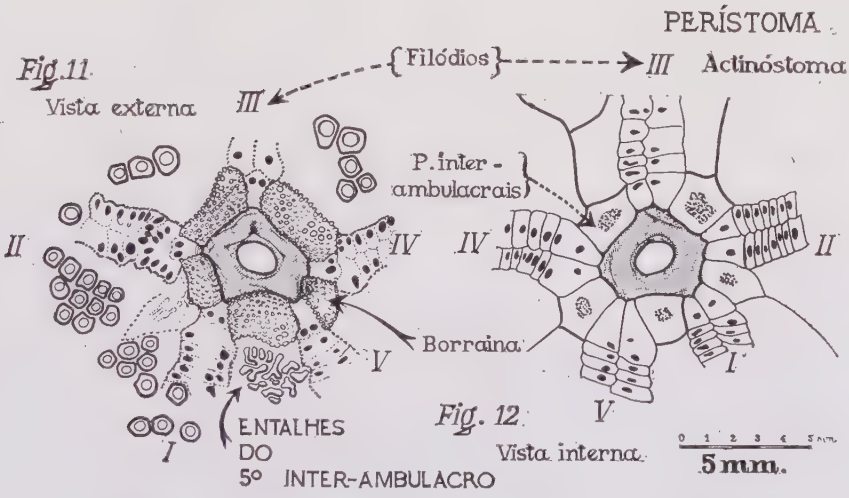
fig. 9

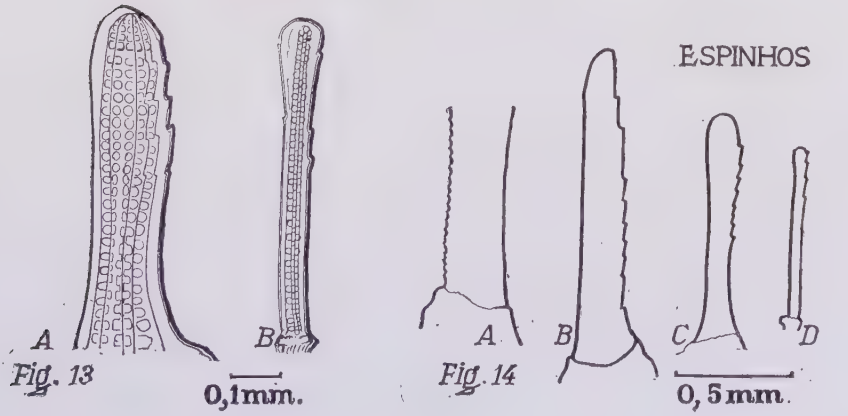
LUIZA KRAU — Nova espécie de *ECHINOIDEA Cassidulus mitis*

(Ordem *Cassiduloidea*)

ESTAMPA IV



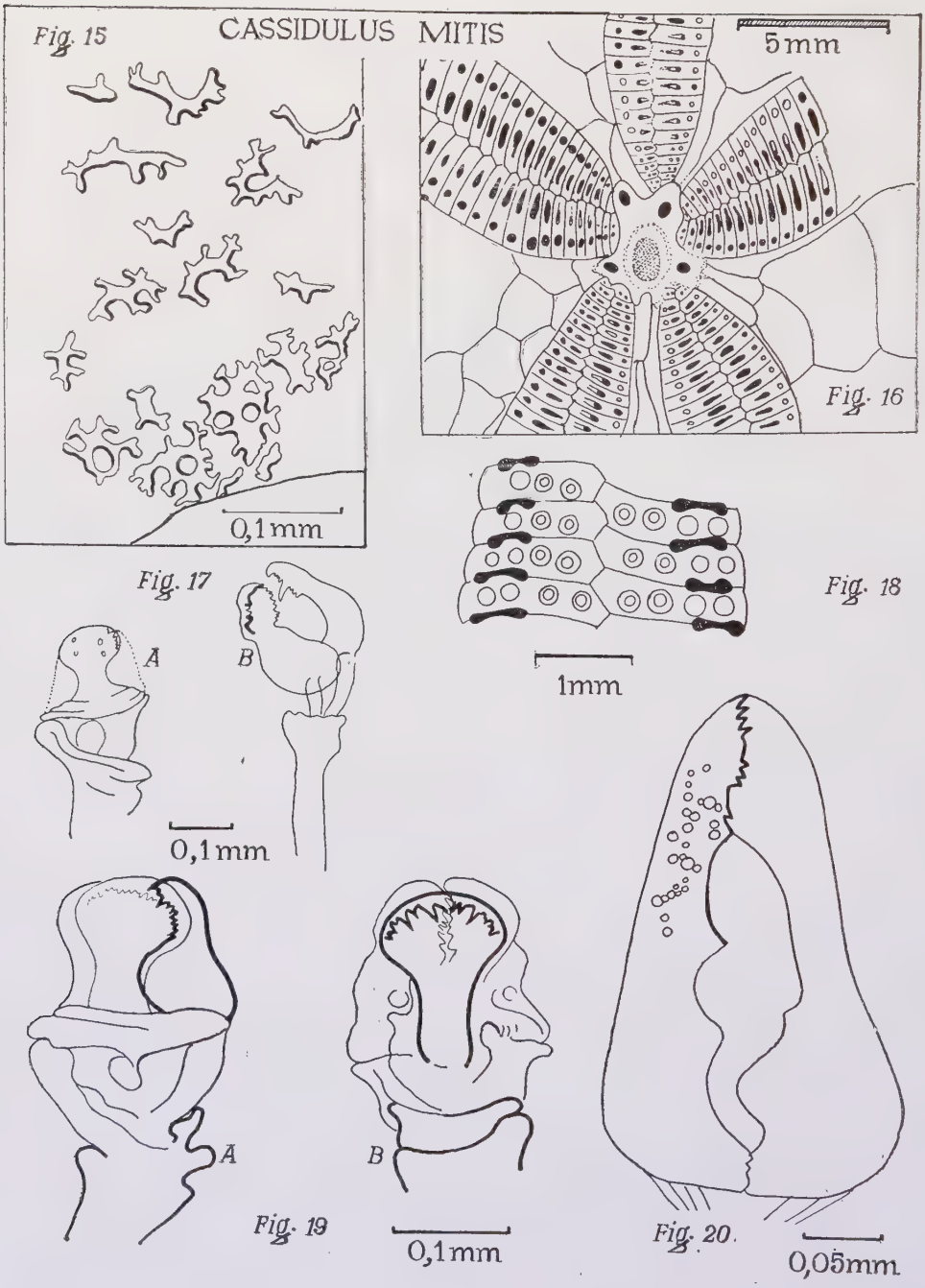




LUIZA KRAU — Nova espécie de *ECHINOIDEA Cassidulus mitis*

(Ordem *Cassiduloidea*)

ESTAMPA V



LUIZA KRAU — Nova espécie de *ECHINOIDEA Cassidulus mitis*

(Ordem *Cassiduloidea*)

ESTAMPA VI

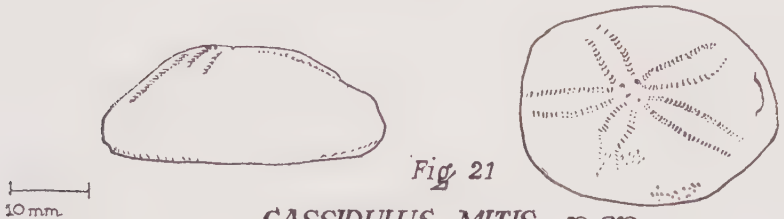


Fig. 21

CASSIDULUS MITIS n.sp.

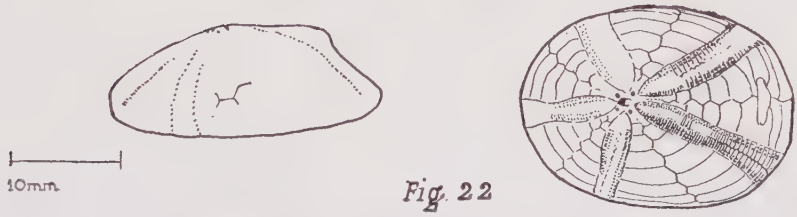


Fig. 22

Cassidulus caribaearum Lamarck

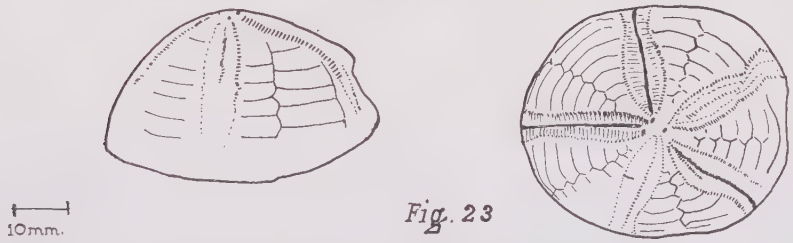


Fig. 23

Cassidulus pacificus (Agassiz)

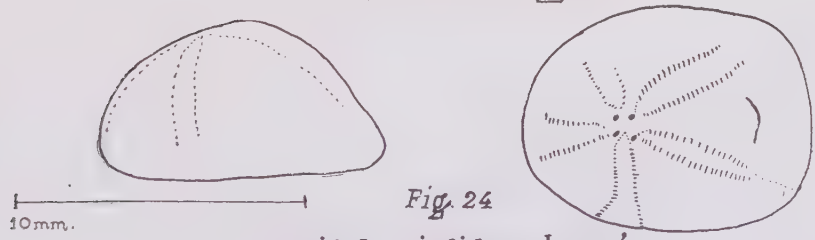


Fig. 24

Cassidulus infidus Lovén

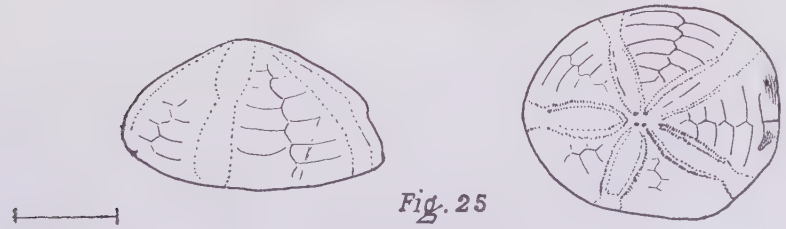


Fig. 25

Cassidulus eugeniæ Lovén

A Doença de Chagas no Paraná

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

Em recente discurso o Dr. Mário Pinotti informou que o Serviço Nacional da Malária, em 1953, fêz em 23 municípios do Paraná, a busca de transmissores da Doença de Chagas numa área de 30.224 km2, e que de 895 localidades inspeccionadas 678, ou 75,75, estavam infestadas pelo *Triatoma infestans* Klug 1834, e que em 234 dessas localidades, ou sejam 34,5 %, êsse vector, a única espécie encontrada, apresentava-se infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. O índice geral de infecção natural foi de 18,86 %. Informou, ainda, o Dr. Pinotti, que a reação de Machado-Guerreiro, feita em sôros de 1923 indivíduos do município de Jacarézinho foi positiva em 206, ou sejam 10,7 %, subindo êste índice a 28,3 % em Boa Vista, município de Wenceslau Braz, onde, de 159 sôros examinados, 45 deram resultados positivos.

Êstes importantes informes me sugeriram trazer à Academia alguns dados históricos sôbre o assunto. Em 1917 chefiei uma comissão médica incumbida de combater a malária no Norte do Paraná, quando ali ocorreu o mais grave dos seus surtos epidêmicos, até hoje registrados. De março a junho percorri 8 dos seus municípios. Na então comarca de São José da Bôa Vista, que hoje o Dr. Pinotti dá como localidade do município de Wenceslau Braz (então um recém-formado núcleo chamado Km. 53 da Estrada de Ferro Jaguariaíva-Jacarézinho), fotografei, no mês de Março de 1917, quatro doentes, uma moça e três meninas, as duas maiores quase em anasarca — sobreviventes à grande epidemia palúdica — e com edema bipalpebral que, em 1943, o Dr. Pinho Simões classificou como «idêntico ao sinal de Romaña», criado em 1935. Mostrando essa fotografia ao Professor Salvador Mazza, em 17 de Setembro de 1946, êle escreveu debaixo dela a seguinte declaração: «En mi concepto estes son típicos enfermos de Enfermedad de Chagas». Tôda esta Academia conheceu o grande tropicalista argentino Salvador Mazza, o médico que tinha maior experiência e maior número de trabalhos publicados sôbre a doença de Chagas, portanto a sua opinião era para nós muito valiosa. Vem agora o S. N. M., 36 anos depois da minha descoberta casual, confirmar, pela reação sorológica, que São José da Bôa Vista é um antigo e grave foco da Doença de Chagas. Desde essa extinta comarca, Wenceslau Braz, Tomazina, Colônia Mineira (hoje Siqueira Campos) até Santo Antônio da Platina, é território povoado sobretudo por mineiros, que para ali se mudaram com os seus enormes e cantantes carros de bois cheios de «tarécos», como dizem êles. A meu vêr nas suas canastras e cêstos levaram o *Triatoma megista* (hoje *Panstrongylus megistus*) infectado, e talvez também levaram enfermos da tripanosomiase entre os emigrados.

(*) Trabalho lido na Academia Nacional de Medicina aos 10 de Junho de 1954.

Em abril de 1917 descobri, no Jataí, então distrito judiciário da comarca do Tibagí, situado à margem direita do rio dêste mesmo nome, a 300 m de altitude e a cêrca de 100 km do rio Paranapanema, um grande foco de *Triatoma megista*. Jataí foi sede duma Colônia Militar criada pelo Decreto Imperial n.º 751, de 2 de janeiro de 1851, e instalada a 10 de agôsto de 1855 pelo Major Thomaz José Muniz, a qual prestou grandes serviços ao país durante a guerra do Paraguai e foi extinta depois da Revolução de 1893. Na margem esquerda do Tibagí, defronte do Jataí, existem as ruínas do aldeiamento indígena São Pedro d'Alcantara, confiado, em 7 de Dezembro de 1854, à direção do Frei Thimotheo de Castel-Nuovo.

Encontrei alí cêrca de 200 habitantes, entre indígenas de várias tríbos, brancos, pretos e mestiços. Havia entre os brancos e negros, que se chamavam de «Portuguêses», e assim eram tratados pelos indígenas, muitos casos de bócio, nessa época ainda subordinado à doença de Chagas. Criado o Serviço de Profilaxia Rural no Paraná, foi baixado a 8-10-1918, pelo Decreto Estadual n.º 779, o seu Regulamento, elaborado por mim, em cujos artigos 75 a 81 incluí tôdas as medidas capazes de dominar a endemia chagásica. Sôbre êsse Regulamento assim se manifestou em 1945, o Doutor Emmanuel Dias, o mais experimentado profilata dessa doença, no Brasil: «Embora redigido há 26 anos, pode ainda hoje ser adotado na íntegra, pois encerra as mais importantes medidas que as autoridades sanitárias podem ter tomado ao instituir um combate eficaz à moléstia». Dentre essas medidas estabelecia o expurgo dos domicílios infestados por Triatomas e proibia a construção de casas de parêdes de barro e cobertura de palha; facultava às autoridades sanitárias a demolição de tais habitações quando não permitissem reforma e tornava obrigatória a construção de habitações à prova de barbeiros nos núcleos coloniais, industriais ou emprêsas ferro-carris. Recomendava o extermínio dos tatús, época em que êstes eram considerados como os únicos reservatórios do *Trypanosoma cruzi*.

Em abril de 1919 voltei ao Jataí com o fito de aplicar o Regulamento Sanitário Rural na extinção do foco da Doença de Chagas. Das 43 habitações existentes no distrito, sòmente 3 tinham algumas parêdes de tábuas, tôdas as demais eram de paus à pique, ripas ou taquáras dispostas em sentido transversal e revestimento de barro. Tôdas as 43 habitações eram focos do *P. megistus* (única espécie encontrada na região) do qual capturei uma grande quantidade para o Instituto Oswaldo Cruz, preparei coleções completas de ovos, larvas, ninfas e adultos para as Universidades do Paraná e de Lima (Perú), a pedido do Professor Paz Soldán. Todos os exemplares que remeti ao Dr. Carlos Chagas êle próprio verificou estarem infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Ficou assim confirmada a existência da tripanosomiase americana no Paraná. Daquelas 43 habitações fiz demolir 10, as mais infestadas e promoví a reforma das outras com o auxílio de empregados do Serviço de Profilaxia Rural. No Jataí havia casas com tantos «chupões» que ninguém podia dormir nelas. Em Maio de 1919, em pleno dia, vi triatomas adultos sugarem crianças quando dormiam, e fui informado serem êsses hematófagos conhecidos nos sítios, fazendas e habitações ribeirinhas do Tabagí, até à sua embocadura no Paranapanema. Na mesma ocasião inspeccionei os aldeia-

mentos de índios guaranís, caiuás e coroados de São Pedro d'Alcantara, Tira-Fubá, Engenho de Ferro e Limoeiro e não encontrei nenhum triatoma nas suas choças, impróprias para criação dêsse insecto. Também não encontrei nenhum indígena com bócio, não só na região do Jataí como nos aldeiamentos de São Jerônimo. De São Jerônimo até às cidades de Tabagí e Castro inspeccionei várias localidades, onde o bócio e o cretinismo eram freqüentes, mas não encontrei mais barbeiros e sim, nas colmeias, em abundância, o *Apiomerus canips* Fabricius, que Carlos Chagas considerava como hematófago, mas não transmissor do tripanosoma.

Em Fevereiro de 1918 o Dr. Lutz e eu encontramos, na cidade da Fóz do Iguaçú, um *Triatoma sordida*, que na mesma ocasião verificámos ser abundante nos galinheiros de Três Lagôas, em Mato Grosso.

Conta o Dr. Carlos F. F. da Costa que em 1936 o Dr. Bruno Cichon capturou em Araucaria (Campos Gerais) alguns exemplares do *P. megistus* e que também foi encontrado no Cajurú, arrabalde de Curitiba, e nesta capital, na Avenida Vicente Machado, o Dr. Matos Sounis capturou, a 22-2-940, um exemplar macho dessa espécie. Em 1946, portanto 25 anos depois de ter iniciado a profilaxia da doença de Chagas no Jataí, ali voltei para verificar a situação do problema: percorri, a cavalo, tendo como guia o farmacêutico do lugar, tôda a vila e seus arredores, e não encontrei mais nenhuma casa de barro, e sim tôdas de madeira serrada e sarrafeada. É oportuno fazer-se ali um novo levantamento dos transmissores e a reação sorológica nos seus habitantes.

Em 1943 o Dr. Pinho Simões dá o *Triatoma infestans* como presente em oito municípios do Paraná, sendo um nos Campos Gerais, Piraquára, a 25 km de Curitiba, donde os Drs. Rosenfeld e Cardoso em 1941 examinaram 7 exemplares adultos dos quais dois infectados pelo tripanosoma e quatro ninfas negativas, e sete no Norte do Estado: Carlópolis, Wenceslau Braz, Tomazina, Siqueira Campos, Joaquim Tavora, Santo Antônio da Platina e Jacarézinho. Dos 6 primeiros dêste grupo êle examinou 85 exemplares, encontrando 40 infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, ou sejam 47 %. Os municípios com mais altas incidências foram Joaquim Tavora, 74,2 % (de 31 exemplares examinados, 23 foram positivos) e Carlópolis 26,9 % (de 26 examinados, 7 foram positivos).

O S.N.M. iniciou, em fevereiro de 1953, o seu primeiro inquérito sôbre a doença de Chagas no Paraná, e em Novembro seguinte já pôde apresentar ao XI Congresso Brasileiro de Higiene, em Curitiba, três trabalhos, sendo um estabelecendo as normas gerais para êsse inquérito, outro sôbre a distribuição geográfica do *Triatoma infestans* no Estado e o terceiro referente ao inquérito sorológico realizado em Jacarézinho pelos Drs. Bustamante, Matta Pires e Batista, do qual transcrevo os seguintes informes: Jacarézinho tem 38.695 habitantes espalhados em 691,5 km2, vivendo em 7.804 habitações. Em 14 localidades do município sangraram 2.154 indivíduos, aproveitando 1.923 sôros que foram examinados no Instituto de Malariologia, do Rio de Janeiro. Feita a reação de Machado-Guerreiro nesses sôros, 206 deram resultados positivos, dando o índice geral para o município de 10,7 %. Na sede do município foi adotado o critério de

colhêr sangue de todos os moradores de uma de cada treze casas, em todos os bairros. Dos 676 sôros colhidos na cidade 62 foram positivos, ou sejam 9,2 %. Tôdas as amostras de habitantes do centro da cidade foram negativas, entretanto 11 dos 94 sôros da zona suburbana, Vila Leão, foram positivos (11,7%). Dos 1.247 sôros das zonas rurais 144 (11,5%) deram resultados positivos. Os índices mais altos foram os verificados em Monjolinho (33,6%), Fazenda Vista Alegre (25,8%) e Fazenda Cachoeira (15,4 %). Todos os 94 sôros de Coqueiralzinho deram reação negativa, não obstante ser foco de *Triatoma infestans,* não informando os autores

SERVIÇO NACIONAL DE MALÁRIA **Quadro 1**

Resumo dos Trabalhos Contra a Doença de Chagas, Realizados no Estado do Paraná, Durante o ano de 1953.

MUNICÍPIOS	N.º DE LOCALIDADES		ESPÉCIES ENCONTRADAS	NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS			
	Investigadas	Positivas		Capturados	Examinados	Positivos	% de infectados
Alvorada do Sul	25	18	*T. infestans*	89	49	1	2,0
Andirá	51	51	»	702	460	83	18,0
Boraiúva do Sul	27	0	–	–	–	–	–
Cambará	50	44	*T. infestans*	875	615	74	12,0
Carlópolis	22	22	»	165	125	35	28,0
Centenário do Sul	26	23	»	393	300	47	15,7
Cerro Azul	17	0	–	–	–	–	–
Guaraquaçaba	19	0	—	—	—	—	—
Jacarézinho	83	70	*T. infestans*	1,316	1,077	275	25,5
Leópolis	43	33	»	184	114	4	3,5
Lupionópolis	18	18	»	240	211	16	7,6
Nova Esperança	38	3	»	66	61	0	—
Paranavaí	44	2	»	31	8	0	—
Primeiro de Maio	42	41	»	232	154	3	1,9
Porecatú	21	18	»	415	329	19	5,8
Ribeirão Claro	58	57	»	577	417	66	15,8
Santa Mariana	58	53	»	334	216	7	3,24
Santo Inácio	25	21	»	362	264	0	—
Sengés	44	27	»	1,310	594	56	9,4
Sertaneja	39	39	»	146	90	8	8,9
Siqueira Campos	69	69	»	1.178	723	172	23,8
Timbu	13	0	—	—	—	—	—
Wenceslau Braz	73	73	*T. infestans*	4.040	1.894	587	31,0
23	899	682		12.655	7.701	1.453	18,9

se êste vector apresentava infecção natural pelo *Trypanosoma*. A positividade da reação sorológica distribuída pelos grupos etários revelou: 8,8 % nos indivíduos de 1 a 9 anos; 11,3 % nos de 10 a 19 e 27,8 % nos de 20 a 39 anos. A meu vêr a doença de Chagas, para o município de Jacarézinho, foi importada do município paulista de Itaporanga, que lhe fica fronteiro e onde os Drs. Rosenfeld e Cardoso encontraram 45,3% dos *Triatomas infestans* examinados, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, e descreveram, em 1941, dois casos agudos da doença no homem e em dois cães. Os exemplares de *Triatoma infestans* que êsses autores capturaram em Assis, Ipaussú e Pirajú, outros municípios paulistas fronteiriços ao Norte paranaense, estavam isentos de infecção.

Devo à gentileza do Dr. Bustamante, epidemiologista do S.N.M., os dados do Quadro 1, que dá a lista dos 23 municípios levantados, em 19 dos quais foram encontrados *Triatomas*, exclusivamente da espécie *infestans*. 682 das 899 localidades trabalhadas, portanto 75,8 %, estavam infestadas por êsse transmissor. Essa infestação subiu a 100 % nos municípios do Norte, povoados sobretudo por emigrados mineiros, tais como: Wenceslau Braz, Siqueira Campos (antiga Colônia Mineira), Sertaneja, Lupionópolis, Carlópolis e Andira. O total de transmissores capturados subiu a 12.655. Dos 7.701 examinados 1.453, ou 18,9 %, estavam infectados. Os focos mais graves são: Wenceslau Braz com 31 %; Carlópolis com 28 %; Jacarézinho com 25,5 % e Siqueira Campos com 23,8 %. O quadro 2 se refere a 2.588 reações em sôros de habitantes dos municípios de Jacarézinho e Sengès, dando 323 positivas, ou 12,6 %. Neste ano de 1954 o S.N.M. está prosseguindo o seu levantamento nos seguintes 25 municípios e fará o expurgo domiciliar em 8 outros.

SERVIÇO NACIONAL DA MALÁRIA **Quadro 2**

ESTADO DO PARANÁ

Reações para fixação do complemento, realizadas durante o ano de 1953.

MUNICÍPIOS	N.º DE LOCALIDADES	NÚMERO DE SÔROS			
		COLHIDOS	EXAMINADOS	POSITIVOS	% de POSITIVIDADE
Jacarezinho	14	2.154	1.923	206	10,7
Sengés	8	712	635	117	18,4
TOTAL	22	2.866	2.588	323	12,6

MUNICÍPIOS PROGRAMADOS PARA 1954

a) *Levantamento* — Mandaguaçu, Astorga, Jaguapitã, Florentópolis, Bela Vista do Paraíso, Sertanópolis, Uraí, Cornélio Procópio, Bandeirantes,

Santo Antônio da Platina, Joaquim Távora, Quatiguá, Japira, Pinhalão, Ibaiti, Jaguariaíva, Piraí do Sul, Castro, Rio Branco do Sul, Colombo, Piraquara, Morretes, Antonina, São José dos Pinhais, Guaratuba.

b) *Expurgos domiciliários* — Alvorada do Sul, Centenário do Sul, Leópolis, Lupionópolis, Primeiro de Maio, Porecatu, Santo Inácio, Sertaneja.

Os benefícios que advirão dessa campanha sanitária serão consideráveis e servirão de estímulo aos outros Estados também castigados pelo grave e deprimente flagelo da tripanosomiase.

Manguinhos, 10 de junho de 1954.

Chagas disease in the State of Paraná

SUMMARY

In recent speech in Curitiba (May 22nd, 1954), Dr. Mario Pinotti, Director, Serviço Nacional da Malaria, informed that his personnel started on February, 1953, a survey upon Chagas Disease in 23 counties of the State of Paraná, South Brazil. Out of 895 places surveyed, 678, or 75.7 %, were infested by *Triatoma infestans* Klug 1834 and in 234 out of those 678, or 34.5 %, this vector was infected by *Trypanosoma cruzi*. The general natural infection of the insects examined reached 18.86 %. The serological survey (Machado-Guerreiro test) was positive in 10.7 % of the persons examined in Jacarezinho and in 28.3 % of those living in Bôa Vista.

These data suggested the author to actualise the subject. During his control of a severe outbreack of malaria in the North part of Paraná, from March to June 1917 he worked in 8 counties. March 1917 he photographed in Boa Vista four girls, severe cases of chronic malaria, two of which showed bi-palpebral oedema, later on considered by Dr. Pinho Simões (1943) as Romaña syndrome (created in 1935) and Prof. Salvador Mazza (1946) classified as typical cases of Chagas' Disease. Now, being elapsed 36 years, the National Service of Malaria confirmed the discovery.

The region surveyed was populated, in the beginning of this century, by immigrants from the State of Minas Gerais, from where the author believes that were imported the disease and its vectors. In April 1917 the A. discovered that the old town Jatahy was a big focus of *Triatoma megista* (now Panstrongylus megistus). All its 43 houses were strongly infested by such hematophagus and amongst the 200 inhabitants seen many were suspicious cases of chronic cases of Chagas' Disease. In the Indians town (three tribes) of S. Pedro D'Alcantara, situated in front of Jatahy, in the left side of the river Tibagy, there were no Triatomas nor suspicious cases of trypanosomiasis.

In 1919 the author started the control of the endemics by destroying the foci of Triatomas and reforming the housing. In 1946 he returned to Jatahy and found the sanitary conditions of the town and its inhabitants much better.

Climate of the region is favorable to spreading of all tropical diseases, being very suitable one for an extensive sanitary survey.

Phot. n. 60 — S. José da Boa Vista - (Norte do Paraná) Phot. Dr. Souza Araujo

MALARIA CHRONICA. — (SOBREVIVENTES Á GRANDE EPIDEMIA DE 1917).

Em meu conceito estes meninos representam os casos de infantilidade de chagas Rio 17-IX-18

In 1943 Dr. Pinho Simões examined 85 triatomas *(T. infestans)* from six counties of the North region and found 40, or 46% infected by *Trypanosoma cruzi*. The highest incidences were: Joaquim Tavora 74.2 % and Carlópolis 26.9 %. These counties seem to be infested by Itaporanga county of São Paulo State.

In 1953 Serviço Nacional da Malária proved that 19 out of 23 counties surveyed were infested by *Triatoma infestans*. They examined 7,701 of this insect and found 1,453 positive for *Trypanosoma cruzi*, or 18.9 %. In two counties, Jacarezinho and Sengès, were examined 2,588 human bloods, not selected, and 323, or 12.6 %, of such samples were positive for Chagas' Disease. This year the Malaria Service is doing insects survey in 25 other counties and DDTising infested domiciles of another eight.

Such activity is very promising and should be extended to other places.

BIBLIOGRAFIA DA DOENÇA DE CHAGAS NO PARANÁ

1. Lutz, Adolpho, Souza-Araujo, H. C. de e Fonseca O. da

1918. Viagem cientifica no Rio Paraná e a Assuncion com volta por Buenos Aires, Montevidéo e Rio Grande. (De janeiro até março de 1918. Com reproduções de fotografias tomadas pelos Drs. Araujo e Fonseca). Memórias do Inst. Osw. Cruz, T.X. pp. 104/73. Manguinhos. ("Clima e Estado Sanitário pelo Dr. Souza-Araujo", pp. 117/57).

2. Regulamento Sanitário Rural do Paraná.

1918. Decreto n. 779, de 8 de outubro de 1918. Presidente Affonso Alves de Camargo, Secretário do Interior Enéas Marques dos Santos. Da doença de Chagas (*Trypanosomiase americana*). Arts. 75/81.

3. Souza-Araujo, Dr. H. C. de

1919. *A doença de Carlos Chagas no Paraná*. In Paraná Medico, A. III, Ns. 11 e 12 Curitiba, junho e julho, pp. 558/59.

4. Souza-Araujo, Dr. H. C. de

1919. *Doença de Carlos Chagas in* A Prophylaxia Rural no Estado do Paraná. Esboço de Geographia Medica. Curitiba, Paraná, pp. 305/9.

5. Souza-Araujo, Dr. H. C. de

1919. *Notas epidemiológicas do Jatahy* (E. do Paraná). *In* A Folha Médica, (Ano I, Ns. 1-24, 1920). Provavelmente de 1919, vol. não numerado, pp. 1-182. pp. 121/22.

6. Costa, Dr. Carlos F. F. da

1940. Comunicação a respeito de triatomideos em Curitiba. *Triatoma megista* (Burmeister, 1835). Revista Médica do Paraná, A. IX, Ns. 11-12, pp. 299/300.

7. Rosenfeld, Dr. Gastão e Cardoso, Dr. Francisco A.

1941. Distribuição dos Triatomideos e da Moléstia de Chagas no Estado de São Paulo (Brasil). Revista Clínica de S. Paulo, V. IX, n.º 6, pp. 198/209.

8. Simões, A. J. Pinho.

1943 *Doença de Chagas no Estado do Paraná, Brasil. Esboço epidemiológico.* — Memórias do Inst. Osw. Cruz, T. 39, agosto-dezembro, pp. 279/90. Com 1 estampa.

9. Dias, Dr. Emmanuel

1945. *Um ensaio de profilaxia de moléstia de Chagas.* Publicação do Instituto Oswaldo Cruz. Imprensa Nacional, Rio, p. 116.

10. Fernando M. de Bustamante, W. da Matta Pires e Sebastião Mariano Batista

1953. *Doença de Chagas no municipio de Jacarèzinho, Estado do Paraná.* Trabalho do S.N.M., apresentado ao XI Congresso Brasileiro de Higiêne, Curitiba, 15 a 21 de novembro. (8-6-54: Ainda inédito).

11. Pinotti, Mário.

1954. *Programa de Doença de Chagas.* Do discurso pronunciado no Palácio do Govêrno do Paraná, a 22 de maio, *in* Jornal do Commercio, Rio, 2-6-54.